Aus dem Medizinischen Institut für Umwelthygiene
an der Universität Düsseldorf
Direktor: o. Prof. Dr. med. H.-W. Schlipköter

UNTERSUCHUNGEN ZUR KÜNSTLICHEN INFEKTION DER STECHMÜCKE AEDES VEXANS (MEIGEN) MIT DEM TAHYNA-VIRUS

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

FRANK NELLES

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543909_0056

Aus dem Medizinischen Institut für Umwelthygiene
an der Universität Düsseldorf
Direktor: o. Prof. Dr. med. H.-W. Schlipköter

Untersuchungen zur künstlichen Infektion der Stechmücke Aedes vexans (Meigen) mit dem Tahyna-Virus

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Frank Nelles

1983

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Hopf

Referent

gez.: Prof. Dr. Schlipköter

Koreferent

gez.: Prof. Dr. Mehlhorn

Inhalt

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1	Das Tahyna-Virus	1
1.2	Die Stechmücke Aedes vexans	4
1.3	Virus, Vektor und Wirt: ökologische Beziehungen	7
1.4	Unterschiedliche biologische Eigenschaften verschiedener Stämme eines Virus	10
1.5	CO_2-Sensitivität	14
2.	Aufgabenstellung	18
3.	Material und Methoden	19
3.1	Virus	19
3.2	Versuchstiere:	
3.2.1	Mäuse	20
3.2.2	Hamster	20
3.2.3	Mücken	20
3.2.3.1	Aufbau und Einrichtung des Insektariums	20
3.2.3.2	Aedes vexans	24
3.2.3.3	Culex pipiens	27
3.3	Untersuchungsmethoden:	
3.3.1	Virustitration in der Babymaus	28
3.3.2	Qualitativer Virusnachweis in Deckglaszellkulturen	29
3.3.3	Indirekte Immunfluoreszenztechnik	31
3.3.4	Infektiöse Blutmahlzeit	32
3.3.5	Untersuchung von Mücken auf ihren Virusgehalt (qualitativ, quantitativ)	33
3.3.6	CO_2-Exposition von Mücken	34
3.3.7	Pufferlösungen	35

Inhalt (Forts.)

		Seite
4.	Versuche und Ergebnisse	36
4.1	Gewinnung eines sekundär extraneuralen TAHV-Präparates	36
4.1.1	Vorversuche	36
4.1.2	Gewinnung von TAHV aus extraneuralen Geweben der Babymaus	38
4.1.3	Weitere extraneurale Passagen	40
4.1.4	Vergleichende Charakterisierung des Präparates "DÜSSELDORF"	43
4.2	Versuche zum Virus-Vektor-Wirt-System	48
4.2.1	Infektion von Stechmücken mit TAHV per os	48
4.2.2	Übertragung des TAHV durch Aedes vexans auf einen Hamster	61
4.2.3	Versuche zur CO_2-Sensitivität	64
5.	Diskussion	70
5.1	Rückadaptation des TAHV an den extraneuralen Passageweg	70
5.2	Das Virus-Vektor-Wirt-System im Labor	75
5.3	CO_2-Sensitivität bei Aedes vexans durch das TAHV	83
6.	Zusammenfassung	86
7.	Literaturverzeichnis	88

Verzeichnis der Tabellen

Nr.	Titel	Seite
1.5.1	CO_2-Sensitivität durch Virusinfektionen bei Arthropoden	17
4.1.1 a)	Virustiter in extraneuralen Organen 5-6 Tage alter Babymäuse nach subkutaner Inokulation des Präparates NEW HAVEN	37
4.1.1 b)	Virustiter in extraneuralen Organen 5-6 Tage alter Babymäuse nach intrazerebraler Inokulation des Präparates NEW HAVEN	39
4.1.2	Virämie 5-6 Tage alter Babymäuse nach subkutaner Inokulation virushaltiger Blut- und Gewebeproben	40
4.1.3	Extraneurale Passagen in 5-6 Tage alten Babymäusen	42
4.1.4	Virämie 6-tägiger Babymäuse nach subkutaner Inokulation des Präparates PRAG	43
4.1.5	Letalität verschiedener TAHV-Präparate für Babymäuse nach icer und scut Inokulation	45
4.1.6	Virämie bei Hamstern nach intramuskulärer Inokulation verschiedener Viruspräparate	47
4.2.1	Versuch 4.2.1: Untersuchungen an einzelnen Mücken (Aedes vexans)	50
4.2.2	Versuch 4.2.2: Untersuchungen an einzelnen Mücken (Aedes vexans)	52
4.2.3	Versuch 4.2.2: durchschnittlicher Virusgehalt pro Mücke (Aedes vexans)	52
4.2.4	Versuch 4.2.2: Titerverlauf in der Blutmahlzeit	53
4.2.5	Versuch 4.2.3: Untersuchungen an einzelnen Mücken (Aedes vexans)	54
4.2.6	Versuch 4.2.3: durchschnittlicher Virusgehalt pro Mücke (Aedes vexans)	54
4.2.7	Versuch 4.2.3: Titerverlauf in der Blutmahlzeit	56
4.2.8	Versuch 4.2.4: Untersuchungen an einzelnen Mücken (Culex pipiens)	57
4.2.9	Versuch 4.2.5: Virustiter in verschiedenen Phasen frisch bereiteter infektiöser Blutmahlzeiten	59
4.2.10	Versuch 4.2.6: durchschnittlicher Virusgehalt pro Mücke unmittelbar nach einer infektiösen Blutmahlzeit	59

Verzeichnis der Tabellen (Forts.)

Nr.	Titel	Seite
4.2.11	Ergebnisse des CO_2(warm)-Tests bei Mücken aus Versuch 4.2.1	64
4.2.12	CO_2-Sensitivität bei Mücken aus Versuch 4.2.3 (Exposition bei + 1° C)	65
4.2.13	CO_2(warm)-Test und Exposition bei + 1° C; Vergleich der Ergebnisse (Versuch 4.2.3, am 9., 11. und 15. Tag nach Infektion)	67
4.2.14	CO_2-Sensitivität bei Mücken aus Versuch 4.2.7 (Exposition bei + 1° C)	68
4.2.15	Zusammenfassung CO_2-Tests: Versuch 4.2.3 und 4.2.7 (Exposition bei + 1° C)	69
5.2.1	TAHV und Aedes vexans: Infektionsraten in Abhängigkeit vom Virustiter der Blutmahlzeit	77

Verzeichnis der Abbildungen

Nr.	Titel	Seite
1	Weibchen von Aedes vexans bei der Eiablage	5
2	Grundriß des Insektariums	22
3	Stammbaum der für die Versuche verwendeten Aedes vexans Generationen	26
4	Aedes vexans bei der Blutmahlzeit vom Tupfer	32
5	Aedes vexans bei der Blutmahlzeit am Hamster	62
6	Grafische Darstellung zu Tabelle 4.2.12	66
7	Grafische Darstellung zu Tabelle 5.2.1	77

Abkürzungen

BME	= Basal Medium Eagle
CEV	= California Encephalitis-Virus
D-MEM	= Dulbeccos's Modification of Eagle's Medium
EDTA	= Ethylendiamintetraazetat
ENP	= Extraneurale Passage
FITC	= Fluoresceinisothiocyanat
GMK-Zellen	= Green monkey kidney-Zellen
icer	= intrazerebral
ID	= Infektiöse Dosis
IF	= Immunfluoreszenz
i.m.	= intramuskulär
JCV	= Jamestown Canyon-Virus
KG	= Körpergewicht
LAC	= LaCrosse-Virus
LNM	= Leber/Nieren/Milz
log	= Logarithmus zur Basis 10
LU	= Lunge
MGP	= Mäusegehirnpassage
MIU	= Medizinisches Institut für Umwelthygiene
PBS	= Phosphate Buffered Saline
RNS	= Ribonukleinsäure
scut	= subkutan
SMICLD	= Suckling Mouse Intracerebral Lethal Dose
TAHV	= Tahyna-Virus
VSV	= Vesicular Stomatitis-Virus
WEE	= Western Equine Encephalomyelitis-Virus (westliche Pferdeenzephalitis)
ZM	= Zungenmuskel
ZNS	= Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1 Das Tahyna-Virus

Erstisolierung

Die Suche nach der Ursache unklarer fieberhafter Erkrankungen und gelegentlicher aseptischer Meningoenzephalitiden, die vorwiegend bei Kindern auftraten, führte in den späten 50er Jahren im Südosten der Tschechoslowakei zur Isolierung des TAHYNA-Virus aus Stechmücken (Aedes caspius und Aedes vexans), die nahe dem Dorf Tahyna im Freiland gefangen worden waren (BARDOS & DANIELOVA, 1959).

Es war auffällig, daß die Erkrankungen vorwiegend in den Sommermonaten auftraten und auf das genannte geografische Gebiet beschränkt waren. Zusammen mit dem für diese Region bekannten Massenauftreten von Stechmücken führte dies zu der Vermutung, daß es sich um eine Arbovirose handeln könnte, und entsprechend zur virologischen Untersuchung der Culiciden.

Systematische Stellung und Struktur

Serologische Untersuchungen von PORTERFIELD (1961) und CASALS (1962) stellten das Tahyna-Virus in die Gruppe der California Encephalitis-Viren, deren taxonomische Zuordnung sich in den letzten fünfzehn Jahren stürmisch entwickelt hat. Noch 1968 gehörten sie mit einer Anzahl anderer serologisch abgrenzbarer Gruppen, die heute in verschiedenen anderen Virusfamilien plaziert sind, zu der wegen ihrer Übertragbarkeit durch Arthropoden zusammengefaßten Einheit der 'Arboviren' (CHAMBERLAIN, 1968). 1973 waren die Mitglieder dieser ehemaligen Einheit auf die Virusfamilien Picornaviridae, Rhabdoviridae, Reoviridae, Iridoviridae und Togaviridae verteilt worden, zu welch letzterer nun zusammen u.a. mit der Bunyamwera-Gruppe die California Encephalitis-Gruppe zählte (KRIEG, 1973). 1975 schlugen PORTERFIELD et al. die Einführung einer neuen Familie, Bunyaviridae, vor, die

zunächst nur ein einziges Genus, Bunyavirus, enthielt, wozu auch die California-Gruppe gerechnet wurde. Inzwischen sind innerhalb der Familie Bunyaviridae drei weitere Genera (Phlebovirus, Nairovirus, Uukuvirus) definiert worden, an der Stellung der California-Gruppe und damit des Tahyna-Virus hat sich jedoch nichts mehr geändert (BISHOP et al., 1980).

Bei den Bunyaviridae handelt es sich um umhüllte Viruspartikeln von kugeliger Gestalt mit einem Durchmesser von 80 bis 110 nm, die ihre Hülle intrazellulär am glatten endoplasmatischen Retikulum erhalten (budding) und sich in von glatten Membranen begrenzten Vakuolen im Bereich der Golgi-Region ansammeln.

Die Nukleinsäure ist eine einsträngige RNS, die aufgrund des Vorhandenseins einer RNS-abhängigen RNS-Polymerase als Negativstrang-RNS eingestuft wird. Das Genom ist auf drei unterschiedlich große Abschnitte (Large, Medium, Small) verteilt, die in drei getrennte Nukleokapside helikaler Symmetrie verpackt sind und über Wasserstoffbrückenbindungen jeweils ringförmige Strukturen bilden. Auf der Virushülle finden sich 5 bis 10 nm lange Polypeptidprojektionen, in denen bisher zwei als G1 und G2 bezeichnete Polypeptide identifiziert wurden, welche von der M-RNS kodiert werden und das typenspezifische Antigen darstellen. Das Polypeptid des Nukleokapsids, N, wird von der S-RNS kodiert. (BISHOP et al. 1980)

Die California Encephalitis-Gruppe umfaßt neben dem namengebenden California Encephalitis-Virus und dem Tahyna-Virus noch das dem letzteren sehr nahe verwandte Inkoo-Virus (isoliert in Finnland, BRUMMER-KORVENKONTIO, 1973), außerdem Guaroa-, Jamestown Canyon-, Jerry Slough-, Keystone-, LaCrosse-, Melao-, San Angelo-, Serra do Navio-, Snowshoe Hare- und Trivittatus-Virus.

Außer dem Inkoo- und dem Tahyna-Virus sind alle diese Viren in ihrer Verbreitung auf die beiden amerikanischen Kontinente beschränkt. Isolationen des Tahyna-Virus liegen jedoch sowohl

aus Europa (Tsechechoslowakei, Jugoslawien, Rumänien, Italien, Österreich, Deutschland, Frankreich) als auch aus Vorderasien (UdSSR) und Afrika (Mozambique, Kenia) vor (BERGE, 1975).

Klinik

Die pathogenetische Bedeutung der California Encephalitis-Viren für den Menschen war zur Zeit der Erstisolation des Tahyna-Virus noch nicht eindeutig geklärt. Ihre ursächliche Rolle bei einer erheblichen Anzahl menschlicher Krankheitsfälle (vorwiegend bei Kindern) ist jedoch inzwischen erkannt worden: MONATH (1979) berichtet von 1035 gemeldeten Fällen in den USA in den Jahren 1963 bis 1978 mit klinischen Bildern vom unkomplizierten fieberhaften Infekt bis zur tödlich verlaufenden aseptischen Meningoenzephalitis. Die Todesfälle sind jedoch selten (1 %).

HILTY et al. (1972) beschreiben den klinischen Verlauf der California Encephalitis bei Kindern: Charakteristischerweise beginnt die Erkrankung mit Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen und Fieber, bald gefolgt von Apathie und Desorientiertheit. Der Zustand verschlechtert sich im Verlaufe der ersten zwei bis vier Tage zusehends, und es treten Krampfanfälle (62 %), fokale neurologische Ausfälle (20 %), pathologische Reflexe (10 %) und Koma (6 %) auf. Im Verlaufe der nächsten sieben Tage klingt die Krankheit soweit ab, daß die Patienten aus der stationären Behandlung entlassen werden können. In den folgenden zwei bis drei Monaten können noch emotionale Labilität, Reizbarkeit und Kopfschmerzen auftreten.

Das klinische Bild der Tahyna-Virusinfektion weist eine ähnliche Bandbreite auf, ist aber insgesamt milder. An einem Krankengut von 58 Patienten unterscheidet SLUKA (1969) sechs Verlaufsformen: eine grippeähnliche (39,7 %), pulmonale (29,4 %), rheumatoide (10,3 %), abdominale (10,3 %), anginöse (6,9 %) und zentralnervöse (3,4 %) Form. Er fand keine beson-

dere Bevorzugung von jüngeren Altersgruppen oder Kindern, jedoch häufig mitunter schwere Grunderkrankungen (31 %). Von einer tödlich verlaufenden Meningoenzephalitis bei einem 43jährigen Patienten berichten JANBON et al. (1974).

1.2 Die Stechmücke Aedes vexans (Meigen, 1830)

Innerhalb der Insektenordnung der Zweiflügler (Diptera) ist die Familie Culicidae mit ihrer Unterfamilie Culicinae für den Menschen von besonderem Interesse: Es handelt sich um die nicht nur überaus lästigen sondern durch ihre Fähigkeit zur Übertragung von Krankheitserregern auch potentiell gefährlichen Stechmücken. Zu diesen gehört Aedes vexans (Meigen), eine Art, die praktisch weltweit verbreitet ist (HORSFALL et al., 1973). Auch in Deutschland ist sie überall dort zu finden, wo geeignete Lebensbedingungen bestehen (MOHRIG, 1969).

Solche geeigneten Lebensbedingungen finden sich vor allem in den offenen Wiesenlandschaften der Uferniederungen größerer Flüsse, z.B. des Rheins und der Donau, die, abhängig vom wechselnden Wasserstand dieser Wasserläufe, regelmäßig ein- oder mehrmals im Jahr überschwemmt werden. Aedes vexans wird daher z.B. im Verlauf des Mittelrheins zwischen Bingen und Speyer und in den Donauauen bei Wien regelmäßig zur Plage. Die Larven schlüpfen erst relativ spät im Jahr (Sommer- und frühe Herbstmonate), bei früheren Überschwemmungen schlüpfen andere Arten wie beispielsweise Aedes communis oder Aedes cantans.

Die Weibchen von Aedes vexans saugen Blut - in der freien Natur wohl fast ausschließlich erst nach der Kopulation - von verschiedenen warmblütigen Wirbeltieren, u.a. Kühen, Pferden, Kaninchen, dem Menschen, aber auch Vögeln (HORSFALL et al., 1973). Die Blutmahlzeit ist Voraussetzung für die Eibildung,

welche bei 20° bis 25° C etwa 4 bis 5 Tage dauert (SCHULER, 1983). Das Weibchen legt nun die Eier, die erst beim Durchtritt durch die Vagina aus dem Spermavorrat in den Spermatheken besamt werden, einzeln auf feuchtes Erdreich ab (nicht - wie dies bei Culex-Arten der Fall ist - auf offene Wasseroberflächen). Es versucht dabei mit der sehr gelenkigen Spitze des Abdomens, die Eier möglichst unter Pflanzenreste oder in Spalten im Erdreich unterzubringen (Abbildung 1). Die Auswahl des Ablageplatzes richtet sich nach verschiedenen Parametern wie Wassergehalt, Bodenneigung, Vorhandensein bestimmter Mikroorganismen und chemischer Beschaffenheit des Bodens (pH, Salzgehalt).

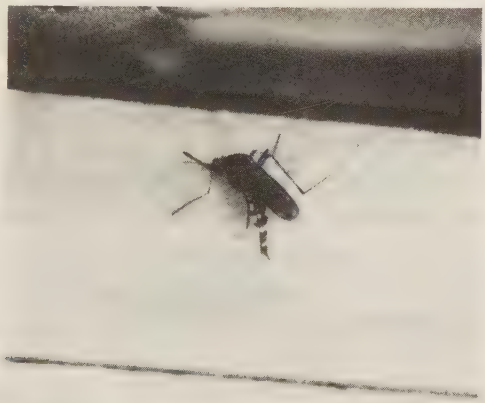


Abbildung 1: Weibchen von Aedes vexans bei der Eiablage auf feuchtes Filterpapier: deutlich ist die lang ausgezogene Spitze des Abdomens zu erkennen. (Das Ei ist nicht erkennbar, da es sehr klein und noch glänzendweiß wie die Unterlage ist.)

Auf der Suche nach einer Blutmahlzeit können sich die Weibchen mehrere km von ihren Brutplätzen entfernen, die Hauptstechaktivität ist in den frühen Abendstunden und während der Dämmerung zu verzeichnen (SCHULER, 1983 und HORSFALL et al., 1973).

Ein Weibchen kann vor der ersten Eiablage mehrmals stechen und blutsaugen, aber auch einen zweiten oder sogar dritten gonotrophischen Zyklus nach wiederholten Blutmahlzeiten durchlaufen. Viele Weibchen sterben jedoch bereits kurz nach der ersten Eiablage.

Wenn nach 4 bis 7 Tagen (bei 25° bzw. 18° C) (HORSFALL et al., 1973) die Embryonalentwicklung abgeschlossen ist, sind die Eier auch bei günstigen äußeren Bedingungen noch nicht alle schlüpfbereit. Ein Teil kann zwar bei entsprechenden Gegebenheiten noch im selben Jahr schlüpfen, die anderen Eier befinden sich jedoch im Zustand der Diapause und werden erst im nächsten Jahr nach Überdauern der winterlichen Kälteperiode wieder schlüpfbereit. Da sämtliche Imagines spätestens beim ersten Frost sterben, stellen diese Eier die Garantie für das Überleben der Art bis zum nächsten Jahr dar. (Bei anderen Arten, z.B. der Gattungen Culex und Culiseta, überwintern dagegen besamte Weibchen, die im nächsten Frühjahr ihre Eier ablegen).

Die Laborzucht von Aedes vexans gestaltet sich schwierig, da die Imagines in Käfigen gewöhnlich nicht kopulieren (HORSFALL et al., 1973), so daß man zu diesem Zweck üblicherweise auf die Kopulation von Hand angewiesen ist. Der in Mainz im Verlaufe vieler Generationen an die Laborhaltung gewöhnte Stamm von Aedes vexans, welcher in Käfigen von 85 l oder sogar nur 18 l Rauminhalt (FRIEDERICH, mündliche Mitteilung) spontan kopuliert, stellt in dieser Hinsicht eine bemerkenswerte Ausnahme dar (SCHULER, 1983).

1.3 Virus, Vektor und Wirt: Ökologische Beziehungen

Obschon es durchaus auch pflanzenpathogene Viren gibt, die durch Arthropoden übertragen werden (Enationmosaik-Virus der Erbse, Kartoffel-Gelbverzwergungsvirus, Wundtumorvirus des Klees u.a.) werden mit dem Begriff "Arbovirus" ausschließlich animale Viren belegt. CHAMBERLAIN (1968) faßt den Begriff so: "Arboviruses are defined as animal viruses transmitted biologically by hematophageous arthropods to vertebrate hosts." Der Terminus "biologische Übertragung" ("biological transmission") kennzeichnet dabei den Umstand, daß der Arthropode den Erreger nicht rein mechanisch von der Infektionsquelle auf den Wirt überträgt, sondern eine biologisch notwendige Rolle in der Erhaltung des Erregers spielt (HUFF, 1931).

Das ökologische Gefüge, das die Erhaltung und Zirkulation eines solchen Virus ermöglicht, ist verständlicherweise kompliziert, und wichtige Glieder des natürlichen Zyklus speziell derjenigen Arboviren, die durch Mücken übertragen werden, sind erst in jüngster Vergangenheit bekannt geworden.

So galt es noch bis vor zehn Jahren als unwahrscheinlich, daß von Culiciden übertragene Arboviren von einer infizierten Mücke auf ihre Nachkommenschaft (transovariell) übertragen werden können (ASPÖCK & KUNZ, 1967 und GUTSEVICH, 1972), ein Mechanismus, der für Zecken und die von ihnen verbreiteten Viren bereits bekannt war. Es wurde ein obligater Wirtswechsel zwischen Stechmücken und Wirbeltieren vorausgesetzt: eine Mücke nimmt das Virus von einem virämischen Wirtstier bei einer Blutmahlzeit auf. Das Virus vermehrt sich nun in den Zellen des Mitteldarms der Mücke und tritt in die Hämolymphe über. Auf diesem Wege erreicht es die Speicheldrüsen der Mücke, in deren Zellen eine weitere Vermehrung stattfindet, bis schließlich komplette Virionen in den Speichel ausgeschüttet werden. Bei der nächsten Blutmahlzeit gelangt das Virus durch den in die Stichwunde abgegebenen Speichel in den nächsten Wirt (vgl. CHAMBERLAIN & SUDIA, 1961).

Die Eignung verschiedener Mückenarten, als Vektoren für ein bestimmtes Virus zu fungieren (ihre Vektorkompetenz), ist unterschiedlich und läßt sich durch die Infektionsschwelle (ein Maß dafür, wieviel Virus die Mücke aufnehmen muß, damit der beschriebene Infektionszyklus abläuft) quantitativ beschreiben (CHAMBERLAIN, 1954).

Voraussetzung für diese Art der Viruszirkulation ist eine ausreichende Zahl von Vektoren (Mücken) und empfänglichen (nicht immunen, also insbesondere jungen) Wirtstieren, sowie ein ausreichender Kontakt zwischen diesen beiden Gruppen. Daher stieß das Verständnis des winterlichen Überlebens des Virus zumindest bei den in erster Linie durch Aedes-Arten übertragenen Viren (also auch beim Tahyna-Virus) auf Schwierigkeiten: Da die Vektormücken den Winter nicht überleben, wäre zur Erhaltung des Virus ein Wirtstier mit einer neun Monate währenden Virämie nötig gewesen, was für Warmblüter für gewöhnlich nicht zutrifft.

Zwar konnte für das Tahyna-Virus eine bis zu 140-tägige Virämie bei Igeln unter Winterschlafbedingungen (SIMKOVA, 1966) und ein Persistieren des Virus in künstlich überwinterten Weibchen der Stechmücke Culiseta annulata (DANIELOVA et al., 1968) nachgewiesen werden, und das Virus konnte sogar aus überwinternden Wildexemplaren von Culex modestus isoliert werden (Südfrankreich, CHIPPEAUX et al., 1970), wesentliche epidemiologische Befunde, z.B. die Tatsache, daß eine aktive Viruszirkulation im Freiland nur von frühestens Juni bis spätestens September nachweisbar war (ASPÖCK et al., 1971), blieben jedoch weiterhin unerklärt.

Erst nachdem 1973 der erste Bericht von transovarieller Übertragung eines Arbovirus (LaCrosse) durch eine Stechmücke (Aedes triseriatus) und Freilanddaten, die die Rolle dieses Mechanismus bei der Überwinterung dieses Virus wahrscheinlich machten (WATTS et al., 1973 und 1974), vorlagen, bot sich eine einleuchtende Erklärungsmöglichkeit. Erste Versuche,

eine transovarielle Übertragung auch beim Tahyna-Virus (in Aedes caspius) nachzuweisen, verliefen zwar negativ (MOREAU, 1976), Untersuchungen von DANIELOVA & RYBA (1979) belegten jedoch die Möglichkeit der vertikalen Übertragung des Tahyna-Virus in Aedes vexans. (Eine Übersichtsarbeit zum Thema der transovariellen Übertragung von Arboviren durch Culiciden liegt vor von ROSEN, 1981).

Der bisher bestuntersuchte Naturherd des Tahyna-Virus ist derjenige in Südmähren, und die dort gewonnenen Erkenntnisse sind zusammenfassend von ROSICKY & MALKOVA (1980) veröffentlicht worden. Dort konnte ein von kultivierter Steppe und mehreren ländlichen Dörfern umgebener Auwald am Fluß Dyje (=Thaya) als Elementarfokus identifiziert werden. Als Hauptvektor fungiert Aedes vexans, Hauptwirte sind Hasen und wilde Kaninchen. Die Rolle des Menschen ist die eines Zufallswirtes ohne Bedeutung für die Viruszirkulation. Die Erhaltung des Virus von Jahr zu Jahr wird durch Persistenz in überwinternden Weibchen von Culiseta annulata und transovarielle Übertragung in Aedes vexans erklärt.

Naturherde des Tahyna-Virus in Deutschland finden sich nach den Untersuchungen von ACKERMANN et al. (1970), SPIECKERMANN & ACKERMANN (1974) und MACKENSTEIN (1983) in zwei geografischen Regionen: erstens am Oberlauf des Mains bei Bamberg, zweitens im Verlauf des Mittelrheins zwischen Speyer und Bingen. In beiden Regionen wurden autochthone Antikörperträger in der menschlichen Bevölkerung und Serokonversionen bei Indikatorkaninchen festgestellt, sowie Stämme des Tahyna-Virus aus wildgefangenen Stechmücken isoliert. Als Hauptvektor ist auch hier in erster Linie Aedes vexans verdächtig.

1.4 Unterschiedliche biologische Eigenschaften verschiedener Stämme eines Virus

Daß sich die biologischen Eigenschaften von Krankheitserregern, insbesondere von Viren, durch serielle Passagen in verschiedenen Umgebungen verändern lassen, ist ein bekanntes Phänomen, das beispielsweise zur Herstellung von Lebend-Impfstoffen gegen einige Viruserkrankungen ausgenutzt wird. Dabei wird das Virus in einer ihm unnatürlichen Umgebung (Zellkultur; Tier, welches im natürlichen Zyklus nicht teilnimmt) über mehrere Passagen attenuiert mit dem Ziel, die Pathogenität für den natürlichen Wirt herabzusetzen, die Fähigkeit, in diesem eine dauernde Antikörperbildung hervorzurufen (Immunogenität), jedoch zu erhalten oder möglichst noch zu steigern. Beispiele für solche attenuierten Impfviren sind der Impfstoff von SABIN (Polio-Schluckimpfung), das Vacciniavirus MVA (Pockenschutzimpfung), die Gelbfiebervakzine, das Masernimpfvirus, Tollwutvakzinen (in der Tiermedizin), die Mumpsvakzine, die Rötelnvakzine, sowie einige Influenza- und Adenovirusvakzinen (DAVIS et al., 1980, S. 1037).

Bei der Untersuchung von Arboviren, ihrem natürlichen Vorkommen und ihren natürlichen Zyklen sind solche Veränderungen der biologischen Eigenschaften durch die Vermehrung im Labor, die für eine Untersuchung unumgänglich ist, nur zum Teil erwünscht. Sie stellen eine wesentliche Erleichterung und Beschleunigung dar bei der Isolierung und Identifizierung von Viruspräparaten aus dem Freiland, wenn sich bei der herkömmlich verwendeten Isolierungstechnik, nämlich der intrazerebralen Verimpfung auf saugende Mäuse, die Inkubationszeit bis zum Auftreten klinischer Krankheitszeichen bei den Versuchstieren im Verlaufe mehrerer Passagen verkürzt (BARDOS et al., 1975). Zudem können Unterschiede in den hervorgerufenen histopathologischen Veränderungen oder der Pathogenität dazu dienen, Neuisolate von Laborkontaminationen zu unterscheiden: ASPÖCK & KUNZ (1966) konnten beispielsweise bei dem TAHV-Isolat "Fischamend" im Gehirn der beimpften Saugmäuse eine Purpura cerebri feststellen, die bei der Verimpfung des

Referenzpräparates "92" (BARDOS & DANIELOVA, 1959) nicht auftrat. DANIELOVA et al. (1970) weisen auf die Möglichkeit hin, häufig intrazerebral vermehrte Viruspräparate an ihrer geringeren Virulenz gegenüber Saugmäusen bei subkutaner Applikation zu erkennen.

Betreffen die durch die Laborvermehrung hervorgerufenen Veränderungen der Viruseigenschaften jedoch Merkmale, die für den Zyklus des Wildvirus von Bedeutung sind, so gefährden sie die Aussagekraft von Untersuchungen beispielsweise zur Vektorkompetenz bestimmter Arthropoden oder zur Empfänglichkeit etwaiger Wirbeltierwirte. So fand BARDOS (1965), daß saugende und junge Mäuse nach Inokulation eines TAHV-Präparates aus der 9. Babymausgehirnpassage eine schwächere Virämie entwickelten als nach Inokulation eines Präparates, das aus demselben Wildvirusisolat durch 7 extraneurale Passagen in Hamstern gewonnen worden war. DANIELOVA (1968) vermutet außerdem, daß neural vermehrte Stämme des TAHV sich auch in der Vektormücke schlechter vermehren als extraneurale Stämme.

Von verschiedenen Autoren sind eine Reihe biologischer Eigenschaften von TAHV-Stämmen jeweils unterschiedlicher Passagegeschichte untersucht worden.

MALKOVA & MARHOUL (1971) untersuchten die von verschiedenen TAHV-Stämmen hervorgerufenen Plaques in GMK-Zellen und fanden bei einem neuralen Stamm (51. Mäusegehirnpassage) kleine Plaques, bei einem extraneuralen Stamm (10. Hamsterblutpassage) dagegen große Plaques. 20 untersuchte Wildstämme (2.-4. MGP) zeigten unterschiedliche Plaque-Größen mit Tendenz zu größeren Plaques. In einer späteren Untersuchung fanden MALKOVA & REDDY (1975) bei 10 Wildstämmen des TAHV bereits in den ersten 3 intrazerebralen Passagen eine Reduktion der Plaque-Größe in GMK-Zellen. Keine signifikanten Veränderungen dagegen fanden sich in der Thermostabilität und der Virulenz bei extraneuraler Applikation, zwei Eigenschaften, die als charakteristisch für das Wildvirus betrachtet werden (MALKOVA, 1971a + b; DANIELOVA et al., 1970). Ebenfalls eine

Reduktion der Plaque-Größe in GMK-Zellen fand DANIELOVA (1974) nach jeweils 21 Passagen zweier Stämme des TAHV in Hamstern (extraneural), GMK-Zellen und Aedes albopictus-Zellen. Die Thermostabilität erhöhte sich nach 21 Passagen in allen drei untersuchten Systemen, die Virulenz bei extraneuraler Applikation sank nennenswert nur nach Passagen in Arthropodenzellen.

Bei der Untersuchung zweier dem TAHV nahe verwandter Viren, Jamestown Canyon (JCV) und LaCrosse (LAC), fanden ISSEL et al. (1975), daß bereits eine extraneurale Passage in einem Weißwedelhirsch (Odocoileus virginianus) das Plaque-Verhältnis des JCV (Prototyp, 6. intrazerebrale Passage) deutlich von kleinen zu großen Plaques hin verschob. Wildtypen dieses Virus zeigten ebenfalls überwiegend große Plaques. Beim LAC-Virus (4. intrazerebrale Passage) änderte sich die Plaque-Größe abhängig vom verwendeten Versuchstier: Passage in Streifenhörnchen (Taenias striatus) vergrößerte den Plaque-Durchmesser, Passage in Grauhörnchen (Sciurus carolinensis) verringerte ihn.

WALLNEROVA (1973) konnte bei der Untersuchung von Lymphflüssigkeit und Blut erwachsener Mäuse innerhalb der ersten 24 h nach extraneuraler Applikation (Fußballen) eines vom Menschen isolierten TAH-Virus-Stammes ("669", 2. intrazerebrale Passage) das Virus isolieren, was mit der gleichen Versuchsanordnung bei Verwendung des Stammes "92" (9. intrazerebrale Passage) nicht möglich war. Diese Feststellung paßt zu der Vermutung von BARDOS (1965), daß neurale Varianten des TAH-Virus eine geringere Fähigkeit zur Vermehrung im lymphatischen Gewebe der Maus aufweisen als extraneurale.

Insgesamt betrachtet weisen die genannten Untersuchungen darauf hin, daß die untersuchten biologischen Eigenschaften ("Marker") unterschiedlich gut geeignet sind, ein TAH-Virus-Präparat als "Wildvirus", "neurales Präparat" oder "extraneurales Präparat" einzuordnen:

Die Plaque-Größe ist als Kriterium nicht unbedingt zuverlässig, was auch Untersuchungen von BARDOS & PESKO (1981) belegen, die ein unterschiedliches Verhalten dieses Markers selbst bei Wildvirusisolaten aus der gleichen geografischen Region feststellten.

Ein verläßlicheres Kriterium scheint die Thermostabilität zu sein, welche nach serieller intraneuraler Passage abnimmt, während sie bei extraneuralen Passagen wie beim Wildvirus erhalten bleibt.

Als für eine Unterscheidung am besten geeignet erscheint die Pathogenität gegenüber Saugmäusen bei extraneuraler Applikation, welche im Verlauf mehrerer intrazerebraler Passagen deutlich abnimmt.

Für die praktische Arbeit ist von entscheidender Bedeutung, zu beurteilen, nach wievielen intrazerebralen Passagen bei einem gegebenen Viruspräparat damit zu rechnen ist, daß Veränderungen eingetreten sind, die das betreffende Präparat zur "neuralen Variante" machen.

Bei der Betrachtung des Markers "Pathogenität bei extraneuraler Applikation" ist unter Berücksichtigung der Ergebnisse von MALKOVA (1975) und BARDOS (1965) damit zu rechnen, daß bereits in dem Bereich zwischen der dritten und der neunten intrazerebralen Passage entscheidende Veränderungen in Richtung auf die neurale Variante stattfinden. Das für unsere Versuche anfänglich einzig zur Verfügung stehende Präparat NEW HAVEN in der 13. intrazerebralen Passage ist daher als "neurales" Präparat des TAH-Virus zu betrachten.

1.5 CO_2-Sensitivität

Kohlendioxid stellt für Insekten normalerweise ein völlig harmloses Narkotikum dar. L'HERITIER & TEISSIER bemerkten jedoch 1937, daß Fliegen aus einem bestimmten Stamm von Drosophila melanogaster nach einer solchen CO_2-Narkose zwar wieder aufwachten, jedoch gelähmt waren und infolgedessen bald starben. Ihre Entdeckung führte letztendlich zur Isolation des Sigma-Virus (ein Rhabdovirus), welches als Erreger dieses Syndroms identifiziert werden konnte. Es ist unter Wildpopulationen von Drosophila melanogaster weit verbreitet und wird unter diesen durch mütterliche Vererbung weitergegeben. Das Phänomen wurde, insbesondere unter genetischen Gesichtspunkten, intensiv erforscht und eine Zusammenstellung der bisherigen Kenntnisse findet sich bei BRUN & PLUS (1980).

Die Inokulation einer Sigma-Virus-haltigen Suspension in die Körperhöhle von Drosophila melanogaster verursacht nach einer Inkubationszeit, deren Länge vom Ort der Inokulation abhängt, die beschriebene CO_2-Sensitivität. Die Weibchen "vererben" das Syndrom auf einen Teil ihrer Nachkommen, unter welchen wiederum sich solche finden, die das Syndrom ihrerseits nun auf 100 % ihrer Nachkommen übertragen. Solche Fliegenstämme werden als "Sigma-Virus-stabilisierte Linien" bezeichnet.

Solche stabilisierten Linien zeichnen sich im Gegensatz zu den nicht stabilisierten durch einen niedrigeren Virusgehalt in der einzelnen Fliege aus. Die Vorgänge unterliegen genetischer Kontrolle, sowohl von Seiten der Fliege als auch von Seiten des Virus.

Zur Physiologie der CO_2-Sensitivität ist vergleichsweise wenig bekannt. Die Untersuchungen von BUSSEREAU (1970a + b) zeigten, daß die klassische CO_2-Sensitivität an eine Infektion der Thoraxganglien mit dem Sigma-Virus gebunden ist.

(Hierbei ist anzumerken, daß bei den Fliegen - im Gegensatz zu den Mücken - sämtliche abdominalen Ganglien in den thorakalen Ganglienkomplex integriert sind.) Auch andere Rhabdoviren und ein Picornavirus verursachen bei Drosophila melanogaster CO_2-Sensitivität (siehe Tabelle 1.5.1), wobei für VSV-Indiana eine Besonderheit zu erwähnen ist. Nach Infektion mit diesem Virus tritt eine sogenannte verzögerte Sensitivität auf, die darauf zurückgeführt wird, daß nicht die Thoraxganglien sondern die kephalischen Ganglien, zu denen dieses Virus eine besondere Affinität aufweist, infiziert sind: Nach einer CO_2-Exposition sterben die Fliegen erst zwei bis drei Tage später, vermutlich an einer sensorischen und/oder motorischen Lähmung der Organe der Nahrungsaufnahme.

Daß CO_2-Sensitivität auch bei Stechmücken auftritt, ist dagegen eine erst jüngst entdeckte Tatsache: ROSEN berichtete 1980), daß eine Reihe von Rhabdoviren das Syndrom nach intrathorakaler Injektion in Mücken der Gattung Toxorhynchites, Culex und Aedes hervorriefen, und wies auch bereits auf die Tatsache hin, daß die CO_2-Exposition bei tieferen Temperaturen das Auftreten des Syndroms fördert. 1981 konnte CO_2-Sensitivität dann sowohl bei Laborstämmen als auch bei Wildpopulationen von Culex quinquefasciatus nachgewiesen werden. Der Vererbungsmodus entsprach demjenigen, der 1937 für Drosophila beschrieben worden war (ROSEN & SHROYER, 1981). Das als Ursache vermutete Virus wurde als "Matsu-Agens" bezeichnet (nach der Matsu-Insel vor China, woher die ersten CO_2-sensitiven Tiere stammten).

Den ersten Bericht über CO_2-Sensitivität bei Bunyavirus-infizierten Stechmücken gaben TURELL & HARDY (1980), die das Syndrom bei Aedes dorsalis, Aedes melanimon, Aedes triseriatus und Culex tarsalis nach intrathorakaler Injektion von California Encephalitis-Virus fanden. Bemerkenswerterweise trat CO_2-Sensitivität auch bei Aedes dorsalis und Aedes melanimon auf, welche mit dem gleichen Virus über eine Blutmahlzeit infiziert worden waren. Bei diesem Infektionsweg ließ sich

die Erscheinung jedoch nicht mit der gleichen Sicherheit hervorrufen. Transovariell infizierte Mücken zeigten keine CO_2-Sensitivität, auch blieb die CO_2-Sensitivität bei den Mücken nicht lebenslang erhalten: nach 15, 17 oder mehr Tagen traten in Gruppen intrathorakal inokulierter Mücken wieder nichtsensitive Exemplare auf, wie dies bei Drosophila nach Infektion mit Chandipura-Virus und einigen VSV-Typen zu beobachten ist.

Tabelle 1.5.1 CO_2-Sensitivität durch Virusinfektionen bei Arthropoden

(zusammengestellt nach BRUN & PLUS, 1980; ROSEN, 1980 + 1981 und TURELL & HARDY, 1980)

		ARTHROPODEN								
		Drosophila melanogaster	Culex quinquefasciatus	Culex tarsalis	Toxorhynchites amboinensis	Aedes albopictus	Aedes dorsalis	Aedes melanimon	Aedes triseriatus	Aedes vexans
RHABDO-VIRIDAE	SIGMA-Virus	+	+		+	Ø				
	VSV-Indiana	+	Ø		Ø	Ø				
	VSV-Argentina	+								
	VSV-Brazil	+								
	VSV-Cocal		+		+	Ø				
	VSV-New Jersey	+	+		+	+				
	Isfahan		+		+	Ø				
	Chandipura		+		+	+				
	Piry		+		+	+				
	Flanders		+		Ø	Ø				
	Joinjakaka		+		+	+				
	Gray Lodge		+		+	+				
	Pike fry rhabdo-virus	+								
	Spring viremia of carp virus	+								
?	"Matsu-agent"		+		+					+
TOGA-VIRIDAE	Sindbis	Ø								
	Dengue 2		Ø							
	Jap.-B. Enceph. (JEV)		Ø							
	St. Louis Enceph. (SLE)		Ø							
BUNYA-VIRIDAE	California Enceph. (CEV)			+			+	+	+	
PICORNA-VIRIDAE	IOTA-Virus	+								

2. Aufgabenstellung

Zur Untersuchung der Biologie und Ökologie von Arboviren sind neben Erhebungen im Freiland auch Laborexperimente mit Stechmücken unerläßlich, da nur von ihnen detaillierte Kenntnisse über Infektionsschwellen, Vektorkompetenz, Viruspathogenese und -pathologie zu erwarten sind. Solche Kenntnisse sind zum Verständnis der Ökologie von Arboviren notwendig und angesichts der Bedeutung dieser Erregergruppe für den Menschen (Gelbfieber !) wünschenswert.

Das MIU beschäftigt sich erst seit jüngerer Zeit mit Arboviren und speziell mit dem Tahyna-Virus als einem in der unmittelbaren geografischen Umgebung beobachtbaren Modell. Aufgabe dieser Arbeit war es, den durch die Arbeiten des Mainzer Instituts für Genetik zur Verfügung stehenden Laborstamm von Aedes vexans

1) auf seine Empfänglichkeit für eine Infektion mit dem Tahyna-Virus,
2) auf seine Fähigkeit, das Tahyna-Virus biologisch auf ein Wirtstier zu übertragen,

zu überprüfen.
Alle Untersuchungen anderer Autoren an Aedes vexans mit dem TAH-Virus wurden an im Freiland aufgesammelten Larven oder Imagines durchgeführt, so daß die Verfügbarkeit eines geeigneten Labormodells besonders erstrebenswert ist. Die Abhängigkeit von der sehr variablen Versorgung mit Wildtieren entfällt, und es ist die Möglichkeit zu einer weitgehenden Kontrolle der Umweltbedingungen über den gesamten Entwicklungszeitraum gegeben.

Die Tatsache, daß es sich wie bei den meisten anderen Arbovirusstämmen auch beim TAH-Virus bei dem vorliegenden Material um ein neurales Präparat handelt, bedingte eine weitere Fragestellung: es war experimentell zu klären, ob sich die Veränderungen, die den Wert solcher Präparate für Untersuchungen der geplanten Art einschränken, rückgängig machen ließen. Da dies eine Voraussetzung für die weiteren Versuche darstellte, sind diese Untersuchungen im Abschnitt "Versuche und Ergebnisse" zuerst dargestellt.

3. Material und Methoden

3.1 Virus

Als Ausgangsmaterial wurden zwei verschiedene Stämme des TAHYNA-Virus verwendet.

NEW HAVEN: hierbei handelt es sich um ein neural vermehrtes Präparat in der 13.-15. Babymausgehirnpassage. Material der 12. Babymausgehirnpassage des Referenzstammes "92" (BARDOS & DANIELOVA, 1959) war Herrn Dr. Pilaski 1978 von Dr. R. Shope, Yale Arbovirus Research Unit, New Haven, USA zur Verfügung gestellt worden. Das Präparat liegt als Lyophilisat 10%iger (w/v) Babymausgehirnsuspension in Tris-Puffer vor.

PRAG: Dr. Bardos, Institute of Parasitology, Prag, CSSR stellte uns freundlicherweise den TAHV-Stamm "Tah 236" in Form lyophilisierten Hamsterblutes aus der 11. Blutpassage zur Verfügung. Die Isolationsmischung "236" (BARDOS & DANIELOVA, 1959) aus Aedes vexans war durch intramuskuläre Inokulation 5 mal in Syrischen Hamstern (Cricetus auratus), anschließend 3 mal in Kaninchen (Oryctolagus cuniculus) und wiederum 3 mal in Syrischen Hamstern vermehrt worden. Zur Virusgewinnung wurden bei uns 80 - 120g schwere Syrische Hamster mit je 0,2 ml des unverdünnten Viruspräparates i.m. beimpft. Diese Hamster erhielten zusätzlich Äquivalente von 7,5 bis 8 mg Cortisonacetat/100g KG i.m. als Betamethason (Celestan solubile^{R}, Firma Byk-Essex) oder als Prednisolacetat (Predni-H-injekt^{R}, Firma Sanorania, Mikrokristallsuspension) jeweils einmal 24 h vor und einmal bei der Virusinokulation (BARDOS, 1961). 72 h bis 90 h später wurden die Tiere in Ethernarkose durch Dekapitieren entblutet. Das Blut wurde (heparinisiert mit 30 I.E./ml) bei -70° C aufbewahrt. Zur Heparinisierung wurden entweder Vetren^{R} (Firma Promonta; Heparin-Na, 200 I.E./ml), oder Heparin-Novo^{R} (Firma Novo; 5000 I.E/ml), letzteres zur genauen Dosierung mit Aqua bidest. 10^{-1} verdünnt, benutzt. Bei den Versuchen wurden Viruspräparate aus der 13. und 14. Blutpassage verwendet.

Die Präparate DÜSSELDORF und "icer-Blut" werden im Abschnitt 4.2 (Gewinnung eines sekundär extraneuralen Viruspräparates) beschrieben.

3.2 Versuchstiere

3.2.1 Mäuse

Weiße SPF (specific pathogen free)-Mäuse des Stammes "NMRI" wurden vom Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover bezogen und im hiesigen Tierhaus verpaart. Die Zucht und die Beimpfung und anschließende Beobachtung der Babymäuse erfolgten in getrennten Räumen eines Isolierbereiches außerhalb des Viruslabors. Babymäuse im Alter von 1-6 Tagen wurden verwendet.

3.2.2 Hamster

Die männlichen und weiblichen Exemplare des Syrischen Goldhamsters (Cricetus auratus) entstammten der hauseigenen Zucht des Medizinischen Instituts für Umwelthygiene, Düsseldorf. Sie wurden jeweils unmittelbar vor einem Versuch in das Viruslabor gebracht und dort für die Dauer des Versuches gehalten. Das Gewicht der verwendeten Tiere lag zwischen 80 und 155 g und ist bei den einzelnen Versuchen angegeben.

3.2.3 Mücken

3.2.3.1 Aufbau und Einrichtung des Insektariums

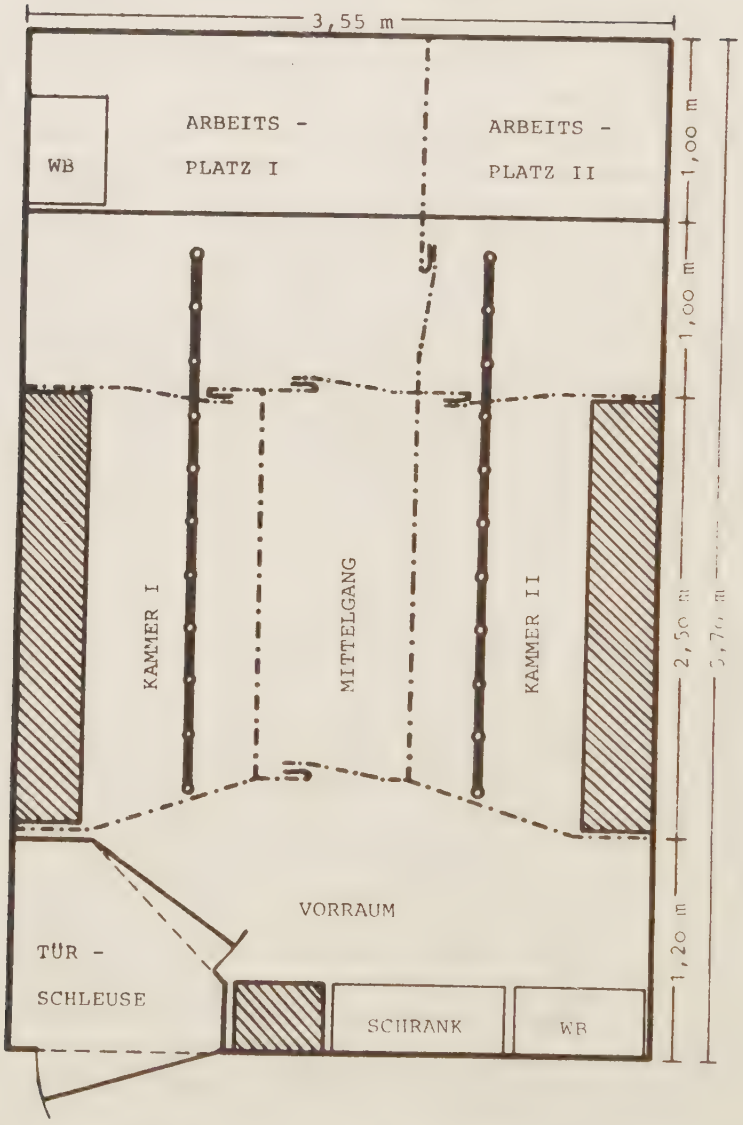
Für die Einrichtung des Insektariums stand ein 3 m hoher Raum mit einer Grundfläche von 5,70 x 3,55 m zur Verfügung. Er liegt im zweiten Stockwerk auf der Nordwestseite des Gebäudes des MIU, Düsseldorf, innerhalb des geschlossenen Viruslaborbereichs mit künstlicher Belüftung.

Dieser Raum wurde durch von der Decke bis zum Boden ausgespannte Nylontüllbahnen (bezogen von der Firma Strumpf Uhlig GmbH, Höfchen 2, D-6500 Mainz) in sechs miteinander über Durchlässe im Tüll verbundene Abschnitte unterteilt. Die Tüllbahnen sind an der Decke an einem Gerüst von Aluminiumschienen befestigt und am Boden mit Tesaband® festgeklebt. Die Nahtstellen untereinander sind ebenfalls mit Tesaband® geklebt. Die Durchlässe werden durch eine am Boden fixierte und eine überlappende freie Tüllbahn gebildet. Die letztere ist an der unteren Kante mit Gardinenschnur beschwert und schleift über den Boden. Der Grundriß der Raumaufteilung (Abbildung 2) zeigt, daß der Zugang zu den Kammern I und II, die der Mückenhaltung dienen, nur aus dem Vorraum über den Mittelgang und die Arbeitsplätze möglich ist. Infizierte Mücken werden nur in Kammer II und dem dazugehörigen Arbeitsplatz gehalten und untersucht, so daß ein Entweichen die Überwindung von mindestens vier Schleusen (Arbeitsplatz I, Mittelgang, Vorraum, Türschleuse) voraussetzt. Die Türschleuse ist aus kunststoffbeschichteten Holzplatten auf einem Metallrahmen gebaut und bietet Platz zum Kleidungswechsel.

Da eine Luftbefeuchtung des ganzen Raumes technisch zu aufwendig und für das Arbeiten darin unangenehm gewesen wäre, wurden die beiden Kammern I und II, einem Vorschlag von ISING (1971) folgend, mit Klarsichtplastikfolie ausgekleidet, so daß die Luftfeuchte in ihnen sowohl voneinander als auch vom übrigen Raum unabhängig gesteuert werden kann. Die für die Haltung von Aedes vexans erforderliche durchschnittliche Luftfeuchte von 70-80 % wird von je einem Luftbefeuchter vom Zerstäubertyp (Defensor 505, 220 V, 200 Watt; bezogen von Weitzdörfer, Wasserweg 34, D-6000 Frankfurt/ Main-Süd), der über einen Hygrostaten gesteuert wird, aufrechterhalten.

In Kammer I, in der die laufende Zucht nicht infizierter Tiere stattfindet, wird außerdem während der Dämmerperioden über einen von einer automatischen Schaltuhr gesteuerten zweiten Hygrostaten eine um 10 % höhere Luftfeuchtigkeit erzeugt.

Abb. 2 : Grundriß des Insektariums



Die Fenster des Insektariums sind mit Aluminiumfolie abgeklebt und die Beleuchtung erfolgt durch 15-20 Tageslichtglühlampen (Philips, 60 W/E 27), die in zwei Reihen in einer Höhe von 2 m angebracht sind (Lage dieser Reihen s. Abbildung 2). Durch eine Schaltelektronik wird ein Langtagrhythmus mit 16 h Licht und 7 h Dunkelheit mit zwei Dämmerungsperioden von jeweils 0,5 h Dauer gewährleistet.

Die Temperatur in den Kammern ist von der Lufttemperatur im umgebenden Raum und der Anzahl der in Betrieb befindlichen Glühlampen abhängig. Sie liegt stets höher als die Temperatur des umgebenden Raumes und weist auch innerhalb der Kammer vom Boden bis zur Decke eine Zunahme um bis zu 6° C auf. Im Durchschnitt liegt die Temperatur bei 23° $\pm$ 4° C auf einer Regalhöhe von 1,20 m. Nachts liegt sie um 2-3° C tiefer. Temperatur und Luftfeuchtigkeit in den Kammern werden fortlaufend mittels eines Thermohygrographen registriert.

In den Kammern I und II befinden sich verstellbare Wandregale (Marke Elementsystem^R), die 40 cm breiten Regalbretter bestehen aus Aluminiumprofilblechen. Das Insektarium ist mit fließendem warmem, kaltem und demineralisiertem Wasser ausgerüstet, Druckluft wird von einem zentralen Anschluß über ein Schlauchsystem mit mehreren Ausgängen in beide Kammern geleitet.

Für die Haltung von Imagines werden 3 verschiedene Käfiggrößen (Tiefe x Breite x Höhe) verwendet:
"A"-Käfige: 38 x 45 x 50 cm = 85,5 l Rauminhalt
"B"-Käfige: 36 x 25 x 20 cm = 18,0 l Rauminhalt
"C"-Käfige: 15 x 10 x 12 cm = 1,8 l Rauminhalt
Die Käfige bestehen aus einer Bodenplatte aus Aluminium, auf die ein Rahmen aus Messingstäben aufgebaut ist. Der Rahmen ist mit Nylontüll bespannt, welcher mit UHU-Alleskleber^R an dem Messinggestänge festgeklebt ist.

Einzelmücken werden mit gläsernen Saugrohren (Ø 10 mm) gehandhabt, Larven und Puppen mit Glaspipetten (Ø 4-5 mm).

Die Imagines werden mit täglich frischen, geschälten Apfelstücken und demineralisiertem Wasser in Schaumstoffschwämmchen (5 x 5 x 5 cm), die auf die Käfige gelegt werden, gefüttert. Die Larven erhalten täglich Tetramin^{R} (Tetra-Werke Dr. Baensch GmbH, D-4520 Melle), das als Pulver auf das Wasser gestreut wird und darin bald zu Boden sinkt.

3.2.3.2 Aedes vexans (Meigen)

Seit Juni 1980 wird in diesem Insektarium ein Ablegerstamm des am Institut für Genetik der Universität Mainz (Vorstand Prof. Dr. H. Laven) aufgebauten Laborstammes von Aedes vexans gehalten. Dieser wurde seit 1974 aus Freilandtieren vom Naturschutzgebiet Kühkopf (Nähe Stockstadt am Mittelrhein) aufgebaut und im Verlauf von 30 Generationen an die Haltung in A-Käfigen gewöhnt. Dabei ist entscheidend, daß die Tiere in diesen Käfigen auch in einem für die kontinuierliche Zucht ausreichenden Maße spontan kopulieren, was - soweit bekannt - für keine andere im Labor gehaltene Aedes vexans-Population zutrifft (KUHN, unveröffentlicht, zitiert nach SCHULER, 1983).

Eier der Generation SB F 16 (der Stamm "SB" = "schneller Brüter" wurde in Mainz auf eine kurze Generationsdauer von 4-6 Wochen hin selektiert, die allerdings bei der hiesigen Weiterzucht nicht aufrechterhalten wurde) wurden in einer Bodenprobe nach Düsseldorf geschickt und hier überschwemmt. Abbildung 3 zeigt einen Stammbaum derjenigen Populationen, die für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche benutzt wurden.

Diese wurden alle aus Eiern großgezogen, die von der Elterngeneration auf Erdschalen abgelegt wurden. Die Erdfüllung besteht aus Walderde mit Moos aus dem Strümper Busch (Meerbusch bei Düsseldorf), die vor der Ablage mit Gras besät wird. Zur Befeuchtung und zur Überschwemmung dient "Brühe",

d.h. Wasser, welches in einer Plastikwanne über Erde aus dem Gelände des MIU ständig mit Luft durchsprudelt wird. Vor der Verwendung zur Überschwemmung der Eier wird diese "Brühe" auf 15° C gekühlt und anschließend - wenn sie über den Eiern steht - durch eine Glühlampe (60 Watt, 7 cm Abstand v.d. Wasseroberfläche) im Verlaufe von etwa 1-1,5 h auf 25° C aufgewärmt. Zusammen mit dem bakteriellen O_2-Verbrauch bewirkt dies den für das Schlüpfen der Larven notwendigen Abfall der Sauerstoffspannung.

In einer Zuchtschale (34 x 24 x 4 cm, Wasserfüllung 2,5-3 l) wurden zwischen 100 und 350 Larven gehalten. Bei ausreichender Fütterung und Wassertemperaturen um 20° C (± 1° C) erreichten die Aufzuchtraten nach 16 Tagen bis zu 80 % (SBc F 18a), was nach den Erfahrungen von KUHN (unveröffentlicht) als normal anzusehen ist. Den erwachsenen Weibchen wurde Blut in einigen Fällen von narkotisierten Mäusen (Nembutal^{R}), meist jedoch vom auf den Käfig gehaltenen Unterarm (des Autors) angeboten, wobei die Weibchen deutlich schneller und zahlreicher saugen als an der Maus.

Die Methoden für die Zucht von Aedes vexans wurden vom Autor bei einem zweiwöchigen Studienaufenthalt am Institut für Genetik in Mainz erlernt und sind von SCHULER (1983) zusammenfassend dargestellt worden.

Bei und nach infektiösen Blutmahlzeiten von Tupfern wurden die Weibchen je nach Anzahl in A-, B-, oder C-Käfigen in Kammer II gehalten. Die durchschnittliche Temperatur betrug dort während der Versuche 22° C (± 3° C).

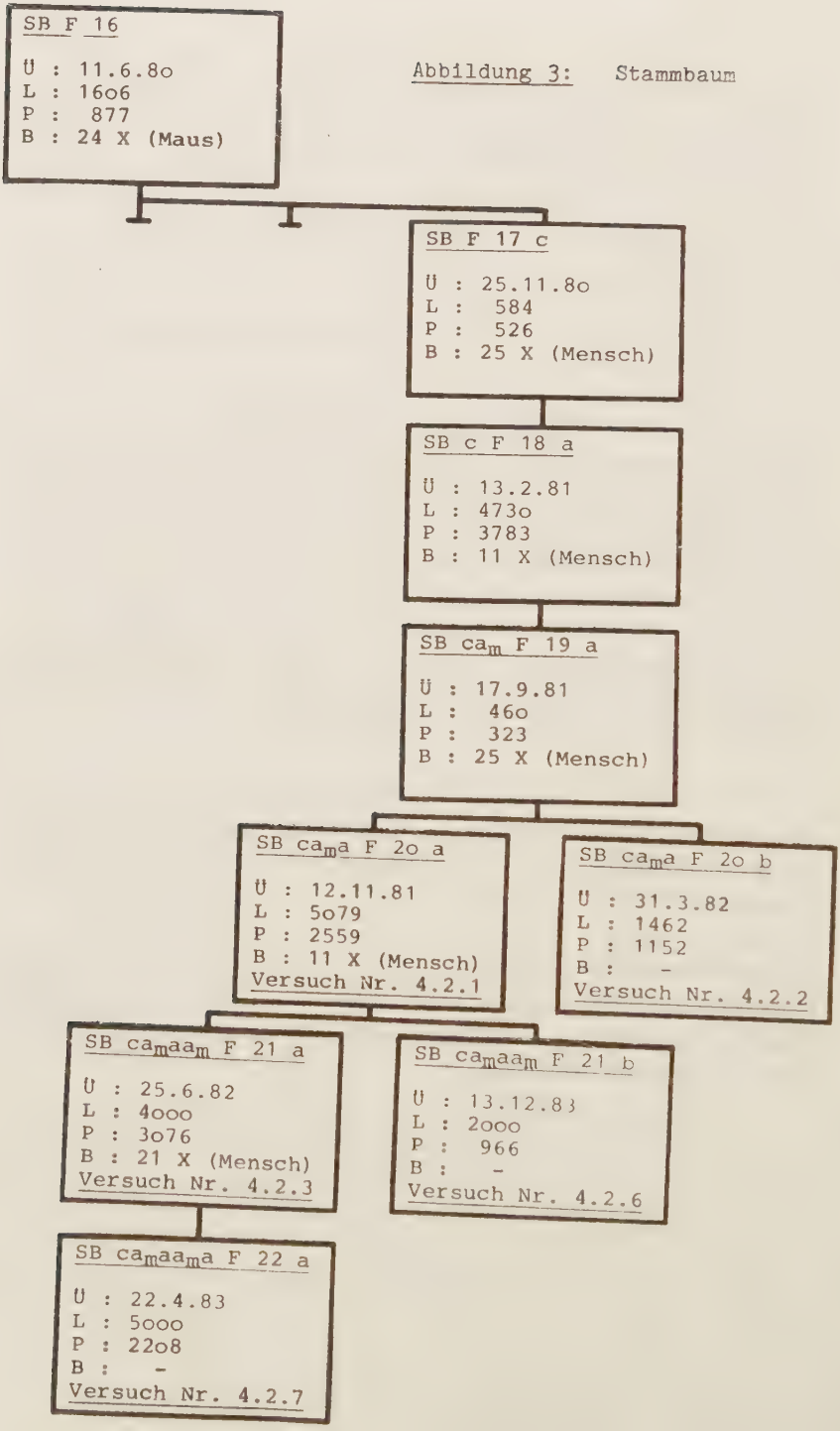


Abbildung 3: Stammbaum

3.2.3.3 Culex pipiens (Linnaeus)

Das Ausgangsmaterial für diesen Stamm wurde ebenfalls vom Institut für Genetik/Mainz zur Verfügung gestellt in Form mehrerer Eischiffchen des Stammes "Culex pipiens Dehli", der seit Jahren in Mainz gehalten wird und sich durch Anautogenie und Stenogamie auszeichnet. Die Imagines wurden in C-Käfigen gehalten, als Blutmahlzeit diente frisches menschliches Blut (auf Tupfern oder vom Unterarm, s.o.), welches den Weibchen im Alter von etwa 10 Tagen angeboten wurde. Die Eiablage erfolgte 6 Tage später auf entsalztes Wasser, dem etwas altes Larvenwasser zugesetzt wurde. Culex pipiens wurde außerhalb der klimatisierten Bereiche bei Raumtemperatur (21° C, ± 3° C) und ca. 40 % relativer Luftfeuchtigkeit gehalten.

Für die Versuche wurden Weibchen der dritten Düsseldorfer Filialgeneration verwendet.

Abbildung 3: Erläuterungen

Eine Erdschale mit Eiern kann mehrmals überschwemmt werden, da bei der ersten Überschwemmung oft nicht alle Tiere schlüpfen (abhängig von der "Temperaturvergangenheit", FRIEDERICH, 1983). Die Überschwemmungen werden fortlaufend mit a, b, c bezeichnet. Nach der Generationszahl stehend bezieht sich diese Angabe auf die bezeichnete Mückengeneration selbst, d.h. bei der "SB F 17 c" handelt es sich um die Mücken aus der dritten Überschwemmung der Eier der 17ten Generation des SB-Stammes (gelegt von Weibchen der F 16). Vor der Generationszahl stehend bezieht sich die Angabe auf die Elterngeneration(en), d.h. bei den Eltern der "SB ca F 19" handelt es sich um die Mücken aus einer Erstüberschwemmung, bei den Großeltern um Mücken aus einer dritten Überschwemmung.
Das "m" im Index bedeutet, daß es sich um eine Auswahl besonders kräftiger Tiere aus der betreffenden Population handelt.

3.3 Untersuchungsmethoden

3.3.1 Virustitration in Babymäusen

Es wurden 1 bis 2 Tage alte Babymäuse mit je 0,03 ml Suspension (Dosierspritze "Stepper^{R}", Firma Tridak, Nr. 4001-010) intrazerebral beimpft. Die Titration erfolgte in 10er Verdünnungsstufen mit jeweils mindestens 6 beimpften Mäusen pro Verdünnungsstufe. Würfe mit 12 oder mehr Babys wurden zur Testung von 2 Verdünnungsstufen benutzt. Die mit der schwächeren Verdünnung beimpften Tiere wurden zuvor durch Abschneiden der Schwanzspitze gekennzeichnet. Die Tiere wurden mindestens 10 Tage lang täglich kontrolliert. Todesfälle jenseits von 48 h nach der Beimpfung wurden als spezifisch bewertet, in Zweifelsfällen wurden Immunfluoreszenzpräparate von Hirnausstrichpräparaten angefertigt: das tiefgefrorene Baby (-70° C) wurde aufgetaut und das Gehirn mit einer 1 ml-Tuberkulinspritze (2er Kanüle) abgesaugt. Ein Tropfen Hirnmaterial wurde mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und auf einem trockenen entfetteten Objektträger verteilt. Nach Lufttrocknung wurde das Präparat 8 min bei -20° C in Aceton fixiert und anschließend mit der indirekten Immunfluoreszenzmethode (s. 3.3.3) gefärbt.

Die Titerwerte wurden nach der Methode von Spearman (1908) + Kärber (1931) berechnet, alle Titerangaben erfolgen in log $SMICLD_{50}$/0,03 ml (Saugmaus, intrazerebrale Letaldosis).

Als Verdünnungsmedium wurde Trispuffer (pH 8,2) mit 10 % hitzeinaktiviertem foetalen Kälberserum und Antibiotika verwendet. Verdünnungsmedium mit 100 I.E. Penicillin und 100 µg Streptomycin/ml wird im folgenden als "Tris 100", solches mit 500 I.E. Penicillin und 500 µg Streptomycin/ml als "Tris 500" bezeichnet. (Penicillin + Streptomycin: Flow Lab Nr. 16-700-49).

3.3.2 Qualitativer Virusnachweis in Deckglaszellkulturen

Für den Virusnachweis in Zellkulturen wurden GMK-Zellen benutzt (Monkey Vero Cells HD 2003, Firma GIBCO BIOCULT, 171. bis 179. Passage). 5 bis 12 Tage alte Monolayer-Kulturen in Costarflaschen (Costar Nr. 3150, 150 cm^2) mit geschlossenem Zellrasen wurden nach 3 maliger Spülung in PBS (pH 7,4) mit 10 ml Trypsin-EDTA (davon 7 ml wieder abgegossen, sobald erste Zellen sich ablösten) trypsiniert (Flow Lab Nr. 16-891-49) und in 8o ml D-MEM (mit 20 mM Hepes-Puffer, Flow Lab Nr. 12-334-54) pro Costarflasche suspendiert. Das Medium enthielt als Zusätze 4 µM/ml L-Glutamin (Flow Lab Nr. 16-801-49), 50 I.E./ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin und 2,5µg/ml Fungizone^R SQUIBB (Flow Lab Nr. 16-723-46) sowie 10 % foetales Kälberserum. Die Suspension wurde 10 min bei 350 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Bodensatz in 160 ml D-MEM (Zusätze wie oben) resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden je 2 ml in jede Vertiefung einer L-8-Platte (Firma Lux Nr. 5218) ausgesät, auf deren Boden ein Deckgläschen (24 X 23 mm) lag. Auf dieses wurde vor dem Einfüllen der Zellsuspension jeweils 0,1 ml Inokulat gegeben. Für jede Probe wurden zwei Vertiefungen benutzt, als Kontrolle wurde auf jeder L-8-Platte je eine Vertiefung mit dem Präparat NEW HAVEN (0,1 ml, Titer 3 log $SMICLD_{50}$) und mit virusfreiem Medium "Tris 500" beimpft. Die Platten wurden in einer feuchten Kammer bei 37° C inkubiert. Nach 48 h wurde das Medium durch frisches mit 5 % foetalem Kälberserum ersetzt. Ein zweiter Mediumwechsel erfolgte mit dem gleichen Medium 4 Tage später. Nach weiteren 2 Tagen wurden die Deckgläschen nach Spülung (2 X 5 min BME, 1 X 2 min PBS) luftgetrocknet und 8 min bei -20° C in Aceton fixiert. Nach erneuter Trocknung wurden sie bis zur IF-Färbung bei -30° C gelagert.

Anmerkung

GMK-Zellen sind nach den Untersuchungen von SEFCOVICOVA & WALLNEROVA (1967) für den Nachweis sowohl neuraler als auch extraneuraler Stämme des TAH-Virus geeignet.

In einem eigenen Versuch zur Empfindlichkeit der Methode wurde eine Suspension des Präparates NEW HAVEN (Titer in der Saugmaus 4,5 log $SMICLD_{50}$/0,03 ml) in 10er Verdünnungsstufen auf Zellkulturen (L-8-Platten, jeweils 10 Vertiefungen pro Verdünnungsstufe, Inokulat 0,1 ml) ausgesät. Mit der Immunfluoreszenztechnik wurde ein Titer von 3,7 log ID_{50}/0,1 ml festgestellt. Nach entsprechender Umrechnung ergibt sich, daß 1 ID_{50} (Zellkultur/IF) etwa 20 $SMICLD_{50}$ entspricht. Unter Berücksichtigung der Inokulatmenge muß also eine untersuchte Mücke eine Virusdosis von 1,7 log $SMICLD_{50}$ enthalten, damit bei Verimpfung auf Mäuse das Inokulat (0,02 ml) 1 LD_{50} enthält, gegenüber einer Virusdosis von 2,3 log $SMICLD_{50}$ die die Mücke enthalten muß, damit das Inokulat für die Zellkulturtechnik (0,1 ml) 1 ID_{50} enthält. Der Empfindlichkeitsunterschied (0.6 log $SMICLD_{50}$) ist unseres Erachtens klein genug, um bei einer Untersuchung einer großen Anzahl einzelner Mücken auf den Tierversuch zu verzichten. In einem vergleichenden Experiment wurden 21 Mücken unbekannten Infektionsstatus gleichzeitig auf Mäuse und Zellkulturen verimpft. Von den 9 mit der Verimpfung auf Mäuse als infiziert festzustellenden Mücken wurden 8 (88 %) auch von der Zellkulturmethode erfaßt (wobei von der einen nicht erfaßten Mücke nur Kopf + Abdomen suspendiert worden waren). Bei den restlichen 12 Mücken ließ sich mit keiner der Methoden eine Infektion nachweisen. Es erscheint durchaus möglich, daß die Nachweisempfindlichkeit des Zellkultur-systems durch eine weitere Verlängerung der Inkubationszeit verbessert werden kann.

3.3.3 Indirekte Immunfluoreszenztechnik

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurde auf den fixierten Deckglaszellkulturen ein Areal markiert, das sowohl Anteile des meist zentral liegenden dichtesten Zellrasens als auch mehr randständige Gebiete spärlicheren Bewuchses enthielt. Auf dieses Areal wurde ein Tropfen (0,025 ml) Anti-TAH-Immunaszites (1 : 20 verdünnt mit Coons-Puffer, pH 7,4) gegeben. (Die Aszitesflüssigkeit wurde nach der Methode von SARTORELLI et al. (1966) von erwachsenen Mäusen nach 2 Immunisierungsterminen im Abstand von 3 Wochen gewonnen: zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurde der Aszites punktiert und 20 min bei 600 g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in 0,5 ml-Portionen lyophilisiert.)

Nach einer Inkubation von 40 min bei 37° C in einer feuchten Kammer wurden die Deckgläser 5 min unter fließendem Coons-Puffer gespült, luftgetrocknet und anschließend (im selben Areal) mit 1 Tropfen FITC-konjugiertem "Goat-anti-Mouse IgG" der Firma Nordic (verdünnt 1 : 30 mit Coons-Puffer) beschichtet. Nach erneuter Inkubation von 40 min wurden die Deckgläser wiederum 5 min in Coons-Puffer gespült und mit gepuffertem Glycerin auf Objektträgern eingebettet. Die Ablesung erfolgte stets "blind" entweder sofort oder nach Zwischenlagerung bei -30° C mit einem Zeiss Standardmikroskop mit Binokulartubus, Auflichtkondensor IV F, Reflektorgehäuse 2 Fl und einer Quecksilberhöchstdrucklampe (H BO 50 W) als UV-Lichtquelle. Die Zellen wurden bei 100- und 400facher Vergrößerung betrachtet. Die spezifische Fluoreszenz ist bei einiger Übung deutlich als grüne, granuläre, intrazellulärzytoplasmatische Fluoreszenz zu erkennen, die oft, jedoch keineswegs immer, von zytopathischen Veränderungen - wie Abkugelung und Ausbildung fadenförmiger Ausläufer der Zellen mit ballonartigen Auftreibungen - begleitet ist.

3.3.4 Infektiöse Blutmahlzeit

Für Infektionsversuche an Mücken wurde als ein natürlicher Infektionsweg eine virushaltige Blutmahlzeit gewählt. Diese wurde mit Hilfe von Zellstofftupfern angeboten: frisch gewonnenes menschliches Blut (bis auf eine Ausnahme das des Autors) wurde durch Rühren mit einem Glasstab defibriniert und mit entsprechenden Viruspräparaten im Verhältnis 1 : 5 bis 1 : 10 gemischt. Mit dieser Mischung wurden Zellstofftupfer (Purzellin^{R}, Firma Hartmann) (rundgeschnitten, Ø 3 cm) getränkt, die dann auf die Mückenkäfige gelegt und zum Schutz gegen schnelle Austrocknung mit einer umgekehrten kleinen Plastikpetrischale bedeckt wurden (Abbildung 4).

Abbildung 4: *Aedes vexans* bei einer Blutmahlzeit vom Tupfer: erkennbar sind vollgesaugte Weibchen (unten rechts), ein Weibchen, das noch nicht gesaugt hat (Mitte links, Pfeil), sowie ein Männchen (unten links, Pfeil).

Vor einem virämischen Wirtstier hat die Tupfermethode den Vorzug, weniger aufwendig und besser steuerbar zu sein. Das Präparat NEW HAVEN ließ sich überhaupt nur so verfüttern, da eine ausreichende Virämie im Wirtstier (Hamster, Babymaus) nach peripherer Inokulation nicht auftritt (s. Abschnitt 4.1.1). Die Tupfer wurden je nach Saugantwort der Mücken bis zu 3 h auf den Käfigen belassen. Den Mücken wurde 24 h vor der Blutmahlzeit die Kohlehydratnahrung, 3 bis 4 h vor der Blutmahlzeit auch das Wasser vorenthalten. Die Saugantwort bei diesem Verfahren schwankte zwischen 30 % und 100 % (einzelne Saugraten: 31, 32, 37, 77, 84, 88, 95, 100 %). Bezogen auf die Gesamtzahl der Mücken betrug sie 73 % (1278 von 1744). Sie konnte durch Anhauchen und Annähern von Händen oder Gesicht an den Käfig gesteigert werden.

Zur Kontrolle des Virustiters wurden Blutproben entweder nach der Blutmahlzeit aus den Tupfern entnommen oder bereits vor der Mahlzeit abgezweigt, dann jedoch unter gleichen Temperaturbedingungen im Insektarium aufgestellt. Nach der Fütterung wurden die Proben bei -70° C eingefroren und später in Babymäusen titriert.

3.3.5 Untersuchung von Mücken auf ihren Virusgehalt

Zur Bestimmung des durchschnittlichen Virusgehaltes der einzelnen Mücke nach der Blutmahlzeit wurden Stichproben von je 10 Weibchen in 3 ml "Tris 500" (bzw. 2 x je 5 Weibchen in 1,5 ml) in Tissue-grinder-Röhrchen (Bellco Nr. 1977) zerrieben und 10 min bei 8000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in 10er Verdünnungsstufen auf Babymäuse verimpft. Die "Dosis pro Mücke" errechnet sich dann durch Addition von 1 zu dem ermittelten log $SMICLD_{50}$-Wert.

Zur qualitativen Untersuchung einzelner Mücken auf Virus wurden diese in je 1 ml "Tris 500" in Tissue-grinder-Röhrchen suspendiert und 10 min bei 8000 g zentrifugiert. Der Über-

stand wurde unverdünnt entweder in 0,02 ml-Portionen auf Babymäuse oder in 0,1 ml-Portionen auf Deckglaszellkulturen verimpft.

Bis zur Verimpfung erfolgten alle Arbeiten unter Kühlung im Eisbad. Alle Mücken waren bei -70° C zwischengelagert worden.

3.3.6 CO_2-Exposition von Mücken

Die Untersuchung auf CO_2-Sensitivität erfolgte nach zwei verschiedenen Methoden.

Die Mücken in Versuch 4.2.1 sowie einige Mückengruppen in Versuch 4.2.3 wurden folgendermaßen untersucht:
ein C-Käfig (Rauminhalt 1,8 l, s. Abschnitt 3.2.3) mit den zu testenden Mücken wurde in eine Plastiktüte gesetzt, die bei Raumtemperatur mit angefeuchtetem CO_2-Gas solange aufgeblasen und durchströmt wurde, bis alle Mücken zu Boden gefallen waren. Dann wurde die CO_2-Exposition durch Entfernen der Tüte und Zufächeln frischer Luft beendet.

Weibchen, die nach 30 min die Flugfähigkeit nicht wiedererlangt hatten und auch nicht auf den Beinen stehen konnten, wurden als "sensitiv" bewertet, solche, die zwar stehen, jedoch nicht fliegen konnten, als "fraglich-sensitiv". Alle übrigen wurden als "nicht-sensitiv" bezeichnet. Es wurden bis zu 3 CO_2-Expositionen hintereinander an denselben Tieren vorgenommen. Diese Methode wird im folgenden als "CO_2(warm)Test" bezeichnet zur Unterscheidung von der in allen übrigen Fällen durchgeführten Testung durch 15 minütige CO_2-Exposition bei +1° C nach der Versuchsanordnung von ROSEN & SHROYER (1981).

3.3.7 Pufferzusammensetzungen

Trispuffer (nach Ch. Kunz, Wien)

Tris	0,02 M	= 2,4228 g/l
EDTA	0,001 M	= 0,3722 g/l
NaCl	0,13 M	= 7,5972 g/l

mit HCl auf pH 8,2 eingestellt; Indikator: Phenolrot

PBS (pH 7,2):

NaCl	8,00 g/l
KCl	0,20 g/l
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	1,44 g/l
KH_2PO_4	0,20 g/l

Coons-Puffer (pH 7,4):

Lösung A:		Lösung B:	
NaCl	8,77 g/l	NaCl	8,77 g/l
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	1,78 g/l	KH_2PO_4	1,36 g/l

Lösung A und Lösung B werden im Verhältnis 9 : 1 gemischt.

Gepuffertes Glycerin

9 Teile Glycerin + 1 Teil Coons-Puffer

4. Versuche und Ergebnisse

4.1 Gewinnung eines sekundär extraneuralen Viruspräparates

4.1.1 Vorversuche

Für unsere Versuche mit dem TAHV stand uns anfänglich nur das Präparat NEW HAVEN zur Verfügung. Im Hinblick auf Infektionsversuche mit Stechmücken wurde zunächst in Vorversuchen geprüft, wann und in welchem Maße sich mit diesem Material in geeigneten Versuchstieren eine Virämie erzeugen ließ. Hierzu wurden 10 Würfe (insgesamt 107 Tiere) 5-6 Tage alter Babymäuse subkutan (0,03 -0,05 ml am Übergang Nacken-Rücken) mit lyophilisierter Babymausgehirnsuspension (10 % w/v) beimpft und nach Inkubationszeiten zwischen 29 und 187 h durch Dekapitieren in Ethernarkose entblutet. Das Blut wurde in einem gekühlten Plastikröhrchen unter Vorlage von Heparin (10-30 I.E./ml) aufgefangen und zur Kontrolle entweder sofort oder nach Zwischenlagerung bei -70° C intrazerebral auf 1-2tägige Saugmäuse verimpft. Die Mäuse wurden nach dem Entbluten bei -30° C aufbewahrt.
Mit der subkutanen Inokulation zur Erzeugung der Virämie sollte eine weitgehende Annäherung an eine Übertragungsform erreicht werden, die im natürlichen Zyklus des Virus vorkommt. Da von 5-6 tägigen Babymäusen größere Mengen Blut zu gewinnen sind als von neugeborenen Mäusen, wurden jene als Versuchstiere gewählt, obwohl neugeborene Mäuse empfänglicher für die Infektion mit TAHV sind.

Die Ergebnisse der Vorversuche sind in den Zeilen 1-3 der Tabelle 4.1.1a dargestellt und zeigen, daß das Präparat NEW HAVEN ungeeignet ist, bei subkutaner Applikation in 5-6-tägigen Babymäusen eine Virämie hervorzurufen, die hoch genug wäre, Aedes vexans per os zu infizieren: die erreichten Titer überstiegen nicht 0,5 log $SMICLD_{50}$. Der Schwellentiter für die orale Infektion von Aedes vexans beträgt jedoch nach DANIELOVA (1966a) 1,5 log $SMICLD_{50}$ /0,03 ml in der Blutmahlzeit.

Tabelle 4.1.1 a) Virustiter in extraneuralen Organen 5-6 Tage alter Babymäuse nach subkutaner Inokulation des Präparates NEW HAVEN

Organ	Titer des Inokulats (log $SMICLD_{50}$)	Inkubationszeit (h)							
		29	43-49	66-73	94-98	118-123	135-142	163	187
Blut	1,5	-	-	-	<0,3	Ø	-	-	-
	3,5	Ø	Ø	Ø	Ø	<0,3 [1]	-	-	-
	4,1	-	-	-	-	-	0,5 [3]	Ø	Ø
			Ø	Ø	1,2 [2]	Ø	1,0	-	-
Lunge	4,1	-	-	-	-	-	Ø	Ø	Ø
			Ø	Ø	Ø	Ø	2,9 [4]	-	-
Leber, Nieren, Milz	4,1	-	-	-	-	-	1,6	Ø	Ø
			Ø	Ø	Ø	Ø	1,7 [5]	-	-
Zunge	4,1	-	-	-	-	-	Ø	Ø	Ø
			Ø	Ø	Ø	Ø	4,0	-	-

[1] Blut 1751 [2] Blut 1586 [3] Blut 1902 [4] LU 1884 [5] ZM 1884

- = nicht untersucht
Ø = kein Virus nachweisbar

Es wurde deshalb versucht, aus dem neuralen Virusstamm durch serielle extraneurale Passagen einen extraneuralen Stamm zurückzuzüchten, d.h. ein Präparat, das nach extraneuraler (subkutaner) Verimpfung auf 5-6-tägige Mäuse eine Virämie erzeugt, die ausreicht, Vektormücken zu infizieren. Hierzu wurde zunächst das Auftreten von TAHV im Blut und in verschiedenen extraneuralen Organen der jungen Maus nach subkutaner und vergleichend nach intrazerebraler Inokulation des Präparates NEW HAVEN untersucht:

4.1.2 Gewinnung von TAHV aus extraneuralen Geweben der Babymaus

5 weitere Würfe 5-6-tägiger Babymäuse wurden in der beschriebenen Weise subkutan beimpft. 7 Würfe wurden intrazerebral (0,03 ml) inokuliert. Nach dem Entbluten wurden die Mäuse zur späteren Organentnahme bei -30° C eingefroren. Die eingefrorenen Mäuse aus Versuch 4.1.1 wurden bei der anschließenden Aufarbeitung mituntersucht.

Folgende Organe wurden entnommen: Lunge, Leber, Nieren, Milz, Zunge. Alle Arbeiten erfolgten im Eisbad mit sterilen Instrumenten in einem Laminar-flow-Gerät. Von den Organen jeweils eines Wurfes wurden in gekühlten Mörsern (mit sterilem Korund) oder Tissue-grinder-Röhrchen 10%ige (w/v) Suspensionen in "Tris 100" angefertigt.

Lunge und Zunge (Muskelgewebe) wurden getrennt suspendiert, Leber, Nieren und Milz gemeinsam für eine Suspension verwandt, so daß sich aus jedem Wurf 3 Organsuspensionen ergaben. Die Suspensionen wurden 15 min bei 600 g zentrifugiert und die Überstände zur Titration intrazerebral auf 1-2-tägige Saugmäuse verimpft .

Die Zeilen 4-10 der Tabelle 4.1.1a und die Tabelle 4.1.1b zeigen die Ergebnisse: bei subkutaner Applikation ist die Virämie wiederum - auch bei Inokulation einer hohen Virus-

dosis von 4,1 log $SMICLD_{50}$ - schwach. Klinische Symptome wurden nicht festgestellt, das Virus war jedoch sowohl in Lunge und Muskelgewebe (Zunge) als auch in der Gruppe Leber/ Niere/Milz in z.T. hohen Titern (am höchsten im Muskel) nachweisbar.

Nach intrazerebraler Inokulation tritt bereits nach zwei Tagen eine hohe Virämie auf, die meisten Tiere sterben bereits wenig später an einer Enzephalitis, die sich anfänglich in Mattigkeit, Zittern, stereotypen Bewegungen (Kratzen und Strampeln) und schließlich in Krämpfen und Atemlähmung äußert.

Tabelle 4.1.1 b) Virustiter in extraneuralen Organen 5-6 Tage alter Babymäuse nach intrazerebraler Inokulation des Präparates NEW HAVEN

Organ	Titer des Inokulats (log $SMICLD_{50}$)	Inkubationszeit (h) 18	43-45	54	64
Blut	4,1	1,5 [1]	3,2 [2]	-	-
		-	2,7	-	-
		-	-	3,7 [3]	-
		-	-	1,9 [4]	-
Lunge	4,1	Ø	1,0	-	1,9
Leber, Niere, Milz	4,1	Ø	1,0	-	3,2
Zunge	4,1	Ø	2,9	-	-

[1] Blut 1900 [2] Blut 1879 [3] Blut 3489 [4] Blut 3544

Ø = kein Virus nachweisbar
- = nicht untersucht

4.1.3 Weitere extraneurale Passagen

Von den neunzehn virushaltigen Präparaten (Tabelle 4.1.1a und 4.1.1b) wurden sieben für die weitere subkutane Verimpfung (Technik s.o.) ausgewählt. Für die Präparate "Blut 1751", "Blut 1586", "Blut 1902", "LU 1884" und "ZM 1884" bedeutete dies die zweite extraneurale Passage (2. ENP), für die Präparate "Blut 1900" und "Blut 1879" die erste (1. ENP). Wie die Ergebnisse in Tabelle 4.1.2 zeigen, erwies sich das Präparat "Blut 1586" als am besten geeignet, nach subkutaner Verimpfung eine hohe Virämie bei den Versuchstieren auszulösen.

Tabelle 4.1.2 Virämie 5-6 Tage alter Babymäuse nach subkutaner Inokulation virushaltiger Blut- und Gewebeproben

Präparat	Titer des Inokulats (log $SMICLD_{50}$)	Inkubationszeit (h)	Höhe der Virämie (log $SMICLD_{50}$)
Blut 1751	0,3	121	< 0,3
Blut 1586	1,2	82	Ø
		96	3,5
		110	4,3
		146	4,6
Blut 1902	0,5	122	Ø
		144	Ø
LU 1884	3,0	131	Ø
		148	Ø
ZM 1884	3,0	131	< 0,3
		148	Ø
Blut 1900	1,5	128	< 0,3
		147	< 0,3
Blut 1879	3,2	128	< 0,3
		147	0,9

Ø = kein Virus nachweisbar

Ausgehend von diesen drei bei der 2. ENP gewonnenen virushaltigen Blutproben wurden deshalb weitere Passagen durch subkutane Verimpfung und Blutgewinnung nach verschiedenen Inkubationszeiten durchgeführt. In Tabelle 4.1.3 sind die Ergebnisse der insgesamt zehn extraneuralen Passagen zusammengestellt. Ab der 6. Passage war es möglich, die Blutprobe zur Verwendung für die jeweils folgende Passage mit "Tris 100" zu verdünnen, so daß wesentlich mehr Babymäuse beimpft werden konnten. Erst dadurch konnte eine ausreichende Menge Virus für weitere Versuche mit diesem nun als "sekundär extraneural" zu bezeichnenden Präparat gewonnen werden.
Diese weiteren Versuche wurden mit Präparaten der 5.-7. ENP durchgeführt, die zur Unterscheidung von dem neuralen Stamm NEW HAVEN und dem primär extraneural vermehrten Stamm PRAG im folgenden als Stamm "DÜSSELDORF" bezeichnet werden.

Die aus Tabelle 4.1.3 ablesbaren Veränderungen des Virusstammes im Laufe der extraneuralen Passagen werden im Abschnitt 5.1 diskutiert, hier soll jedoch hervorgehoben werden, daß im Verlauf der 3. ENP erstmals klinische Symptome und Todesfälle bei subkutan beimpften Tieren auftraten, da diese Tatsache bei der im folgenden dargestellten Charakterisierung des Präparates DÜSSELDORF mit als Kriterium benutzt wird.

Tabelle 4.1.3 Extraneurale Passagen in 5-6 Tage alten Babymäusen

Passage	Titer des Inokulats (log $SMICLD_{50}$)	Inkubationszeit (h)	Höhe der Virämie (log $SMICLD_{50}$)	Bemerkungen
2. ENP	1,2	82	Ø	
		96	3,5	(Verimpfung von
		110	4,3	"Blut 1586")
		146	4,6	
3. ENP	3,5	96	2,1	16 von 26 Versuchstieren bereits gestorben, die Überlebenden zeigten Mattigkeit, Zittern, Krämpfe, stereotype Kratzbewegungen und Zyanose
	4,3	74	2,1	
		74	1,2	
	4,6	74	2,0	
		74	2,3	
4. ENP	1,3	80	Ø	keine klinischen Symptome
		99	Ø	
	2,0	91	Ø	
	1,9	119	2,9	
		145	Ø	
	2,1	99	Ø	
5. ENP	2,9	44	2,6	keine klinischen Symptome
		78	4,0	1 von 10 Versuchstieren tot, 9
		99	>4,0	2 von 6 Versuchstieren tot
6. ENP	1,0	62	Ø	(Erstmals wurden zur Beimpfung verdünnte Blutproben verwendet)
			Ø	
			<1,0	
			3,0	
			3,3	
		84	≫3,0	
			3,3	
			3,5	
		91	2,2	12 von 23 Versuchstieren tot
	1,5	98	2,0	
7. ENP	1,4	97	4,0	keine klinischen Symptome
			4,2	
			>3,0	1 von 7
			<4,0	2 von 11
			4,6	1 von 13 Versuchstieren tot, Krämpfe bei Überlebenden
		99	4,3	2 von 7
	2,1	97	1,6	7 von 10
			2,0	3 von 12
			2,5	3 von 13
8. ENP	2,2	73	3,8	Versuchstiere matt
9. ENP	0,6	91	2,5	keine klinischen Symptome
			3,0	
10. ENP	0,5	69	3,7	keine klinischen Symptome
		96	2,8	Versuchstiere matt, ataktisch, 1 Paresen der unteren Körperhälfte

Ø = kein Virus nachweisbar

4.1.4 Vergleichende Charakterisierung des Präparates DÜSSELDORF

Drei andere Präparate des TAHV wurden zum Vergleich herangezogen:

- das Präparat NEW HAVEN
- das Präparat PRAG (dieses traf erst nach Abschluß der Passageversuche in unserem Labor ein)
- das Präparat "icer-Blut": dabei handelt es sich um die Proben "Blut 1900", "Blut 1879", "Blut 3489", "Blut 3544" (s.Tabelle 4.1.1), also um Virus, das nach intraneuraler (icer) Beimpfung der Versuchstiere aus deren Blut, also extraneural, gewonnen wurde.

Die folgenden biologischen Eigenschaften wurden vergleichend untersucht:

Fähigkeit zur Erzeugung einer Virämie bei 5-6-tägigen Babymäusen nach subkutaner Inokulation: Diese Eigenschaft geht für die Präparate NEW HAVEN, DÜSSELDORF und "icer Blut" aus den bereits dargestellten Versuchen hervor (vgl. Tabellen 4.1.1/2/3). Für das Präparat PRAG wurde sie nachträglich in gleicher Technik bestimmt: Tabelle 4.1.4.

Tabelle 4.1.4 Virämie 6-tägiger Babymäuse nach subkutaner Inokulation des Präparates PRAG

Inokulat	Titer des Inokulats (log $SMICLD_{50}$)	Inkubationszeit (h)	Höhe der Virämie (log $SMICLD_{50}$)	Bemerkungen
PRAG (14. ENP)	1,9	74	4,5	) keine klin.
			5,1	) Symptome
		97	2,6	)*
			>2,0	)*

* Mattigkeit, Ataxie und Paresen bei den Versuchstieren.

Es zeigt sich, daß die von dem Präparat "icer-Blut" hervorgerufene Virämie - bei fehlenden klinischen Zeichen - nach langer Inkubationszeit (6 Tage) schwach ist (0,9 log $SMICLD_{50}$), obwohl der Titer des Inokulats im höheren Bereich (3 log $SMICLD_{50}$) liegt. Diese Ergebnisse entsprechen den mit dem Präparat NEW HAVEN gewonnenen Erfahrungen.

Das Präparat PRAG dagegen führt, vergleichbar mit dem Präparat DÜSSELDORF, bereits bei Inokulation geringerer Dosen (1,9 log $SMICLD_{50}$) nach kurzer Inkubationszeit (3-4 Tage) zu einer sehr starken Virämie (bis 5 log $SMICLD_{50}$) und wenig später zum Auftreten klinischer Krankheitszeichen bei den beimpften Tieren.

Letalität für 1-2-tägige Babymäuse nach intrazerebraler und subkutaner Inokulation: Verdünnungsreihen der verschiedenen Präparate wurden parallel in der genannten Weise auf Saugmäuse verimpft. Die Ergebnisse wurden in log LD_{50} Titerwerten angegeben (linke Hälfte der Tabelle 4.1.5). Die Titerdifferenz zwischen log LD_{50} (icer) und logLD_{50}(scut) wird von DANIELOVA (1974) als "Index der Invasivität" bezeichnet. Die Zahlenangaben sind als Säulendiagramme veranschaulicht.

Letalität für 5-6-tägige Babymäuse nach subkutaner Inokulation: Dieser Parameter wurde wegen der im Verlauf der extraneuralen Passagen aufgetretenen Todesfälle bestimmt. Wiederum wurden Verdünnungsreihen zur Bestimmung des log LD_{50}-Titers verimpft. Vergleichsgröße stellt hier wiederum der Titer bei intrazerebraler Verimpfung auf 1-2-tägige (!) Babymäuse dar. (Andere, hier nicht dargestellte Versuche zeigten allerdings, daß bei intrazerebraler Inokulation der Altersunterschied von 4 Tagen keinen nennenswerten Einfluß auf die ermittelte Titerhöhe hat. DANIELOVA (1974) berichtet von ähnlichen Ergebnissen.) Analog zum "Index der Invasivität" wurde auch hier die Differenz der beiden Titerwerte bestimmt. Die Ergebnisse zeigt die rechte Hälfte der Tabelle 4.1.5.

Tabelle 4.15 Letalität verschiedener TAHV-Präparate nach icer- und scut-Inokulation

1-2tägige Babymäuse log LD_{50} icer a	1-2tägige Babymäuse log LD_{50} scut b	Differenz (Index der Invasivität) b-a	Präparat	Differenz d-c	1-2tägige Babymäuse log LD_{50} icer c	5-6tägige Babymäuse log LD_{50} scut d
2,0	2,9	0,9	DÜSSELDORF (5. ENP)	- 0,7	4,0	3,3
5,0	3,5	- 1,5	NEW HAVEN (15. neurale Passage)	< - 4,5	4,5	< 0
3,9	3,6	- 0,3	PRAG (14. ENP)	- 1.0	3,9	2,9
n.u.	n.u.	n.u.	"icer Blut"	- 2,3	3,5	1,2

Mit Ausnahme des Präparates DÜSSELDORF in 1-2-tägigen Babymäusen ist die Letalität in allen Systemen bei subkutaner Inokulation geringer. Das Ausmaß dieser Letalitätsminderung ist jedoch unterschiedlich: es steigt bei Verwendung älterer Versuchstiere, wobei auch die Unterschiede zwischen den einzelnen Präparaten deutlicher werden.
Bei Verwendung 1-2-tägiger Babymäuse erreichen die Letalitätsunterschiede bei subkutaner gegenüber intrazerebraler Inokulation (= "Index der Invasivität") kein statistisch signifikantes Ausmaß. (Bei der hier verwendeten Endpunkttitration in 10fachen Verdünnungschritten mit 6 Testeinheiten pro Verdünnungsstufe werden 50fache Unterschiede, entsprechend 1,7 Titereinheiten, als signifikant bewertet (Davis et al., 1980, S. 879)). Es ist jedoch bereits eine Tendenz erkennbar, besonders wenn man die Präparate NEW HAVEN und DÜSSELDORF vergleicht:
bei dem Präparat NEW HAVEN ist eine Letalitätsminderung um 1,5 log $SMICLD_{50}$ festzustellen, während beim Präparat DÜSSELDORF sogar eine Letalitätssteigerung um 0,9 log $SMICLD_{50}$ zu verzeichnen ist.

Bei Verwendung 5-6-tägiger Babymäuse für die subkutane Verimpfung wird die Letalitätsminderung in der Reihenfolge DÜSSELDORF - PRAG - "icer-Blut" - NEW HAVEN ausgeprägter. Im Falle von "icer Blut" und "NEW HAVEN" erreicht sie ein signifikantes Ausmaß (>1,7 log LD_{50}).

Fähigkeit zur Erzeugung einer Virämie bei Hamstern nach intramuskulärer Inokulation: Entsprechend dem Vorgehen bei der Vermehrung des Präparates PRAG auf Goldhamstern (Cricetus auratus) wurden 84 - 155g schwere Tiere dieser Art mit 2 mal 0,2 mg Prednisolon/100g KG i.m. (Prednisolonacetat- Mikrokristallsuspension, Predni-H-injekt^{R}) behandelt und mit 0,2 ml Virussuspension i.m. beimpft. Nach Inkubationszeiten zwischen 76 und 99 h wurden die Hamster entblutet. Das gewonnene Blut wurde in 1-2-tägigen Babymäusen titriert. Klinische Symptome wurden bei keinem Hamster beobachtet.

Die Ergebnisse zeigt Tabelle 4.1.6: auch im Hamster läßt sich mit dem Präparat NEW HAVEN innerhalb der beobachteten Inkubationszeit keine nennenswerte Virämie auslösen, auch nicht bei Inokulation höchster Virusdosen. Die Präparate DÜSSELDORF und PRAG dagegen erzeugen eine hohe, sichere Virämie. Auffällig ist die starke Virämie, die sich mit dem Präparat "icer-Blut" erzeugen läßt.

Tabelle 4.1.6 Virämie bei Hamstern nach intramuskulärer Inokulation verschiedener Viruspräparate

Präparat	Gewicht des Hamsters (g)	Inokulierte Dosis (log SMICLD$_{50}$)	Inkubationszeit (h)	Höhe der Virämie (log SMICLD$_{50}$)
DÜSSELDORF (6. ENP)	105	2,9	90	3,4
	112			3,7
	120			> 4,0
	103	3,7	77	3,7
	100			3,8
	88			> 4,0
NEW HAVEN (15. neurale Passage)	84	2,9	77	Ø
	127			Ø
	118			Ø
	110	> 3,8	90	Ø
	104			Ø
	98			Ø
	98	> 4,5	90	Ø
	114			Ø
	110			< 1,0
PRAG (13. ENP)	80	3,2	71	3,7
	80			> 4,0
	118	3,9	77	3,9
	112	> 3,0	92	3,2
	102			3,5
	103			3,8
	115			3,9
	110			> 4,0
icer-Blut	155	4,5	99	> 4,0

Ø = kein Virus nachweisbar

4.2 Versuche zum Virus-Vektor-Wirt-System

Einleitung

Nachdem die Aedes vexans-Zucht etabliert war und nach Erhalt des TAHV-Stammes "236" aus Prag sogar zwei extraneurale Viruspräparate zur Verfügung standen, konnte mit Versuchen begonnen werden, Mücken zu infizieren. Dabei sollten sowohl die Mücken als auch verschiedene Viruspräparate auf ihre Eignung untersucht werden, in einem Virus-Vektor-Wirt-System im Labor zu funktionieren. Wichtige Teilfunktionen eines solchen Systems sind die Infektion der Mücke, das Überdauern bzw. die Vermehrung des Virus in der Mücke , die horizontale Übertragung des Virus auf einen neuen Wirt und die vertikale (=transovarielle) Übertragung von der Mücke auf ihre Nachkommenschaft. Im folgenden werden Versuche beschrieben zur Infektion von Stechmücken mit dem TAHV, zum Überdauern des Virus in der Mücke und zur horizontalen Übertragung auf einen Wirt. Außerdem werden einige Befunde zur CO_2-Sensitivität infizierter Aedes vexans beschrieben. Ergebnisse von Versuchen zur transovariellen Übertragung liegen z.Zt. noch nicht vor.

4.2.1 Infektion von Stechmücken mit TAHV per os

Versuch Nr. 4.2.1

In einem orientierenden Versuch sollte untersucht werden, ob sich 12 Tage nach einer infektiösen Blutmahlzeit, einer Zeit, die das passive Überdauern des Virus in der Mücke ausschließt (DANIELOVA, 1966b), in den Weibchen von Aedes vexans Virus nachweisen ließ.

Je 166 Mückenweibchen im Alter von 4-6 Tagen aus der Generation $SBca_maF20a$ (s. Stammbaum, Abb. 3) wurde eine Blutmahlzeit mit den Viruspräparaten NEW HAVEN, DÜSSELDORF und PRAG angeboten. Die Blutprobe für die Zubereitung der Blutmahlzeit

stammte von Frau Christa Paulus (Mitarbeiterin im Viruslabor des MIU). Nach 2 h wurden die Tupfer entfernt und die Tiere, die nicht gesaugt hatten, aussortiert. Die verbleibenden Mücken wurden in 2 Gruppen aufgeteilt.

Gruppe A: Weibchen, die eine deutlich sichtbare, voluminöse Blutmahlzeit zu sich genommen hatten.

Gruppe B: Weibchen, bei denen nur durch genaue Inspektion des Abdomens an einem kleinen roten Streifen in dessen kranialem Abschnitt (entsprechend einer Füllung des ventralen Divertikels) festzustellen war, daß sie eine minimale Blutmenge gesaugt hatten.

Nach 12 Tagen wurden die Mücken (nach CO_2-Testung, s. Abschnitt 4.2.3) einzeln bei -70° C eingefroren und anschließend durch Verimpfung auf Mäuse oder Deckglaszellkulturen auf Virus untersucht.

Die Virustiter in den Blutmahlzeiten waren, wie Tabelle 4.2.1 zeigt, bei allen drei Präparaten vergleichbar oder gleich.

Infizierte Mücken fanden sich nach 12 Tagen bei Verfütterung der Präparate PRAG und DÜSSELDORF jeweils sowohl in Gruppe A als auch in Gruppe B. Bei Verwendung des Präparates NEW HAVEN fand sich nach 12 Tagen keine infizierte Mücke, wobei von den 46 untersuchten Tieren 22 durch Verimpfung auf Saugmäuse geprüft wurden. Die geringen Saugraten in diesem Versuch erklären sich aus dem geringen Alter der Versuchstiere, bei Verwendung älterer Mücken lagen sie durchweg höher (s.u.).

Tabelle 4.2.1 Versuch 4.2.1: Untersuchung an einzelnen Mücken (Aedes vexans)

Für die Blutmahlzeit verwendetes Präparat	Titer der Blutmahlzeit (log $SMICLD_{50}$)	Saugantwort (%)	Inkubationszeit (Tage)	Mücken infiziert/untersucht		Infektionsrate (%)		
				Gruppe A	Gruppe B	Gruppe A	Gruppe B	Gesamt
NEW HAVEN	3,2	31	12	0/37	0/9	0	0	0
DÜSSELDORF	3,7	32	12	11/37	3/12	29,7	25,0	28,6
PRAG	3,2	37	12	2/30*	1/7*	6,7*	14,3*	8,1*

* Bei diesen Mücken wurden nur Kopf und Thorax, nicht das Abdomen, auf Virus untersucht. Ein quantitativer Vergleich mit Zeile 2 ist daher nicht möglich.

Versuch Nr. 4.2.2

In diesem Versuch wurden nur die Präparate NEW HAVEN und DÜSSELDORF an 14-20 Tage alte Weibchen von Aedes vexans aus der Generation $SBca_maF20b$ verfüttert. Die genetische Beschaffenheit der Versuchstiere war damit gleich derjenigen in Versuch Nr. 4.2.1.

Für das Präparat NEW HAVEN sollte überprüft werden, ob längere Inkubationszeiten zu einer nachweisbaren Infektion der Mücke führen.

Das Präparat DÜSSELDORF wurde in einem Titer verfüttert, der im Bereich der von DANIELOVA (1966a) angegebenen Schwelle von 1,5 log $SMICLD_{50}$ lag.

Die Fütterungszeit betrug 1,5 h. Sofort nach Beendigung der Fütterung wurden alle Weibchen, die nicht gesaugt hatten, aussortiert.

Einzeluntersuchungen an Mücken wie in Versuch Nr. 4.2.1 erfolgten nach 7, 11, 15, 20, 25 und 41 Tagen. Die durchschnittliche Virusdosis pro Mücke wurde nach 1, 3, 4, 5 und 9 Tagen an Gruppen von je 10 Weibchen ermittelt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.2.2 dargestellt:
wie in Versuch Nr. 4.2.1 waren auch diesmal nach Verfütterung des Präparates NEW HAVEN keine infizierten Mücken nachweisbar. (33 der insgesamt 60 untersuchten Tiere wurden auf Saugmäuse verimpft.)

Nach Verfütterung des Präparates DÜSSELDORF (Titer 1,5 log $SMICLD_{50}$) wurde am 20. Tag nach der Blutmahlzeit ein infiziertes Weibchen gefunden (immunfluoreszenzoptisch auf Deckglaszellkulturen).

Tabelle 4.2.2 Versuch 4.2.2: Untersuchungen an einzelnen Mücken (Aedes vexans)

Für die Blutmahlzeit verwendetes Präparat	Titer der Blutmahlzeit (log $SMICLD_{50}$)	Saugantwort (%)	Mücken infiziert/untersucht nach Inkubationszeit von 7d	11d	15d	20d	25d	41d
NEW HAVEN	3,0	84	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
DÜSSELDORF	1,5	88	0/7	-/-	(1)*/10	1/13	0/10	-/-

* 1 von 6 beimpften Babymäusen gestorben; Spezifität jedoch nicht gesichert, da die Mutter das Baby gefressen hatte.

Tabelle 4.2.3 Versuch 4.2.1: Durchschnittlicher Virusgehalt pro Mücke (Aedes vexans)

Für die Blutmahlzeit verwendetes Präparat	Titer der Blutmahlzeit (log $SMICLD_{50}$)	Virusgehalt (log $SMICLD_{50}$) pro Mücke nach Inkubationszeit von 1d	3d	4d	5d	9d
NEW HAVEN	3,0	1	Ø	Spur ?	Spur ?	Ø
DÜSSELDORF	1,5	< 1	Spur ?	< 1	Ø	< 1

Ø = kein Virus nachweisbar.

In Tabelle 4.2.3 ist der Verlauf der Virusdosis pro Mücke innerhalb der ersten 9 Tage nach der Blutmahlzeit dargestellt: obwohl der Titer in der Blutmahlzeit für das Präparat NEW HAVEN um 1,5 log $SMILCD_{50}$ höher lag, finden sich in der Mücke außer am ersten Tag nach der Blutmahlzeit geringere Virusdosen als für das Präparat DÜSSELDORF.

Der Titer der Blutmahlzeit wurde 1 h, 13 h und 25,5 h nach Beendigung der Fütterung bestimmt, um den Einfluß der Insektariumstemperatur auf den Virusgehalt der Virus-Blut-Mischung zu beobachten. Wie Tabelle 4.2.4 zeigt, sind die Schwankungen im Virusgehalt der Blutmahlzeit im Verlauf von 25 h unerheblich. Die Bestimmung erfolgte aus Proben, die vor der Fütterung unter sterilen Bedingungen abgefüllt worden waren.

Tabelle 4.2.4 Versuch 4.2.2: Titerverlauf in der Blutmahlzeit

Für die Blutmahlzeit verwendetes Präparat	Zeit nach Ende der Fütterung (h)	Titer der Blutprobe (log $SMICLD_{50}$)
NEW HAVEN	1	3,0
	13	2,7
	25	2,5
DÜSSELDORF	1	1,5
	13	1,9
	25	1,7

Versuch Nr. 4.2.3

Zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Infektion mit TAHV in den Weibchen des Aedes vexans-Laborstammes wurden die Präparate DÜSSELDORF und PRAG an 14-20 Tage alte Weibchen der Generation $SBca_maa_mF21a$ verfüttert. Nach einer Fütterungszeit von 2 h wurden wieder alle Weibchen, die nicht gesaugt hatten, entfernt.

Der weitere Ablauf des Versuches unterscheidet sich lediglich in den gewählten Inkubationszeiten von Versuch Nr. 4.2.2 (Untersuchungen zur CO_2-Sensitivität s. Abschnitt 4.2.3).

Die Ergebnisse zeigt Tabelle 4.2.5. Außer am 2. Tag nach der Blutmahlzeit (Präparat PRAG) konnten an allen untersuchten Tagen infizierte Mücken nachgewiesen werden: für das Präparat PRAG bis zum 25. Tag, für das Präparat DÜSSELDORF bis zum 43. Tag.

Die durchschnittliche Virusdosis pro Mücke war für das Präparat DÜSSELDORF an den untersuchten Tagen (1 - 4 - 7) etwa gleich, bei dem Präparat PRAG zeigt sich ein leichter Anstieg vom 1. über den 4. zum 7. Tag: Tabelle 4.2.6.

Tabelle 4.2.6 Versuch 4.2.3: Durchschnittlicher Virusgehalt pro Mücke (Aedes vexans)

Für die Blutmahlzeit verwendetes Präparat	Titer der Blutmahlzeit (log $SMICLD_{50}$)	Virusgehalt pro Mücke (log $SMICLD_{50}$) nach Inkubationszeit von		
		1d	4d	7d
DÜSSELDORF	3,3	2,3	2,8	2,2
PRAG	3,8	2,0	2,4	3,2

Tabelle 4.2.5 Versuch 4.2.3: Untersuchungen an einzelnen Mücken (Aedes vexans)

Für die Blutmahlzeit verwendetes Präparat	Titer der Blutmahlzeit (log $SMICLD_{50}$)	Saugantwort (%)	Mücken: infiziert/untersucht (% infiziert) nach Inkubationszeit von 2d	3d	5d	7d	9d	11d	15d	20d	25d	41d	43d
DÜSSELDORF	3,3	86	1/10 (10)	2/10 (20)	4/10 (40)	2/10 (20)	6/20 (30)	8/20 (40)	3/20 (15)	1/10 (10)	4/10 (40)	5/10 (50)	2/10 (20)
PRAG	3,8	77	0/10 (0)	1/10 (10)	3/10 (30)	3/10 (30)	6/20 (30)	10/20 (50)	9/20 (45)	3/10 (30)	5/12 (42)	-/-	-/-

Wie aus Tabelle 4.2.7 hervorgeht, sind die Titerschwankungen in den bei 20 - 24° C gelagerten Blutproben auch nach 4 Tagen gering (0,4 log $SMICLD_{50}$).

Tabelle 4.2.7 Versuch 4.2.1: Titerverlauf in der Blutmahlzeit bei 22° C

Für die Blutmahlzeit verwendetes Präparat	Zeit nach Ende der Fütterung (h)	Titer der Blutprobe (log $SMICLD_{50}$)
DÜSSELDORF	0	3,3
	23	3,6
	95	2,9
PRAG	0	3,8
	23	3,8
	95	3,4

Versuch Nr. 4.2.4

Bisherige Laboruntersuchungen zur Infektion von Culex pipiens mit TAHV zeigten unterschiedliche Ergebnisse (DANIELOVA, 1966b; PCHELKINA, 1978).

In einem eigenen Versuch wurden nach einer Inkubationszeit von 10 Tagen 18 Weibchen von Culex pipiens einzeln untersucht (Deckglaszellkulturen), von denen 9 mit dem Präparat PRAG und 9 mit dem Präparat DÜSSELDORF gefüttert worden waren. Der Titer der Blutmahlzeit betrug 3,3 log $SMICLD_{50}$ (PRAG) und 3,4 log $SMICLD_{50}$ (DÜSSELDORF). In keiner der untersuchten Mücken war das TAH-Virus nachweisbar: Tabelle 4.2.8.

Tabelle 4.2.8 Versuch 4.2.4: Untersuchung einzelner Mücken (Culex pipiens)

Für die Blutmahlzeit verwendetes Präparat	Titer der Blutmahlzeit (log $SMICLD_{50}$)	Inkubationszeit (d)	Mücken infiziert / Mücken untersucht
DÜSSELDORF	3,4	10	0/9
PRAG	3,3	10	0/9

Versuch Nr. 4.2.5

Um Ursachen dafür zu suchen, daß nach Blutmahlzeiten, die als Virusanteil infektiöse Babymausgehirnsuspension enthalten, das Virus in geringerer Menge in der Mücke wiederzufinden ist als bei Verwendung virämischen Blutes (s. Versuch 4.2.2), wurde der Aufenthaltsort des Virus in verschiedenen Arten von Blutmahlzeiten bestimmt.

Hierzu wurden wie für eine Blutmahlzeit Mischungen aus defibriniertem, frischem, menschlichem Blut mit verschiedenen Viruspräparaten hergestellt: (9 + 1 v/v)

NEW HAVEN = 10%ige resuspendierte lyophilisierte Babymausgehirnsuspension (Präparat NEW HAVEN).

NH-Filt = die gleiche Suspension filtriert durch ein Acrodisc^{R} - Filter mit 0,2 µm Porenweite (Gelman Nr. 4192).

DÜSSELDORF = virämisches Mäuseblut (Präparat DÜSSELDORF) der 6. ENP.

Die Mischungen wurden 1,5 h bei Zimmertemperatur inkubiert. Sodann wurde jeweils eine Probe entnommen und der Rest der Mischung 10 min bei 8000 g zentrifugiert, um Serum und Zellen zu trennen. Von Serum und Zellmasse wurden ebenfalls Proben entnommen. Alle Proben wurden (nach Zwischenlagerung bei -70° C) in 1-2-tägigen Babymäusen titriert.

Die Ergebnisse zeigt Tabelle 4.2.9: bei Verwendung unfiltrierter Babymausgehirnsuspension finden sich gleiche Mengen infektiösen Virus in Serum und Zellsediment, bei Verwendung filtrierter Gehirnsuspension und virämischen Blutes findet sich der Hauptanteil ($>$ 90 %) der Infektiosität im Serum.

Tabelle 4.2.9 Versuch 4.2.5: Virustiter in verschiedenen Phasen frisch bereiteter infektiöser Blutmahlzeiten

Blutmahlzeit bereitet mit Präparat	Virustiter (log $SMICLD_{50}$)		
	Mischung	Serum	Zellsediment
NEW HAVEN	3,8	3,7	3,8
NH-Filt	3,3	3,4	2,2
DÜSSELDORF	2,8	2,9	1,8

Tabelle 4.2.10 Versuch 4.2.6: Durchschnittlicher Virusgehalt pro Mücke unmittelbar nach einer infektiösen Blutmahlzeit

Bezeichnung der Blutmahlzeit	Titer der Blutmahlzeit (log $SMICLD_{50}$)	Virusgehalt pro Mücke (log $SMICLD_{50}$)	Differenz
"NH"	3,5	1,1	2,4
"NH-opt"	2,4	1,5	0,9
"D'dorf"	3,4	2,2	1,2

Versuch Nr. 4.2.6

Zur gleichen Fragestellung wie in Versuch 4.2.5 wurde ein weiterer Fütterungs- und Infektionsversuch mit Aedes vexans unternommen, da die bisherigen Daten zur Virusaufnahme aus Versuch 4.2.2 erst 1 Tag nach der Blutmahlzeit bestimmt worden waren.

Es wurden drei verschiedene Blutmahlzeiten vorbereitet:

"NH" = normale Blutmahlzeit mit Präparat NEW HAVEN

"D'dorf" = normale Blutmahlzeit mit Präparat DÜSSELDORF

"NH-opt" = 1 ml infektiöse Gehirnsuspension (Präparat NEW HAVEN) - filtriert durch Gelman-Acrodisc^{R}, 0,2 µm Porenweite, s. Versuch 4.2.5 - wurde mit 2 ml defibriniertem Blut gemischt und nach einer Inkubation von 0,5 h bei 22° C für 20 sec bei 70 W bis zur Hämolyse sonifiziert (Labsonic 1510, Firma Braun). Diese hämolytische Probe wurde mit defibriniertem Blut auf 10 ml aufgefüllt.

Es sollte damit die Möglichkeit ausgeschaltet werden, daß sich bei der Mischung des Präparates NEW HAVEN mit menschlichem Blut Virus-Erythrozyten-Agglutinate bilden, die den Mückenrüssel nicht passieren können, so daß größere Mengen Virus gar nicht aufgenommen würden.

Diese Blutmischungen wurden an Weibchen von Aedes vexans (Generation SBca$_m$ aa$_m$ F21b) verfüttert. Unmittelbar nach der Blutmahlzeit wurden jeweils eine Blutprobe und 10 vollgesaugte Weibchen bei -70° C eingefroren und später in Babymäusen titriert. Aus Tabelle 4.2.10 geht hervor, daß der Unterschied zwischen dem Virustiter der Blutmahlzeit und der von der Mücke aufgenommenen Virusmenge bei Verwendung der "NH-opt"-Mischung wesentlich geringer ist als bei Verwendung der normalen "NH"-Mischung.

10 Tage nach der Blutmahlzeit wurden 13 Weibchen, die mit der Mischung "NH-opt" gefüttert worden waren, bei -70° C eingefroren und anschließend sowohl in Deckglaszellkulturen als auch in 1-2-tägigen Babymäusen einzeln auf Virus untersucht. In keiner der 13 Mücken konnte Virus nachgewiesen werden.

4.2.2 Übertragung des TAHV durch Aedes vexans auf einen Hamster

Als Vektormücke kann eine Mücke erst dann bezeichnet werden, wenn sie das Virus, mit dem sie infiziert ist, auch auf ein Wirtstier übertragen kann. Diese Fähigkeit sollte für infizierte Weibchen des Aedes vexans-Laborstammes durch einen Versuch geprüft werden:

Versuch Nr. 4.2.7

8-10 Tage alte Weibchen aus der Generation $SBca_maa_maF22a$ wurden mit einer infektiösen Blutmahlzeit (Präparat PRAG, Titer 3,1 log $SMICLD_{50}$) gefüttert. Nach 7 Tagen wurde ihnen Gelegenheit zur Eiablage auf feuchtem Filterpapier gegeben. Nach der Eiablage wurden sie 11 Tage lang ohne weitere Blutnahrung gehalten. Am 19. Tag wurde ihnen ein gesunder Hamster als Wirtstier angeboten:

20 h vor der Exposition wurden einem 100 g schweren Goldhamster 0,2 ml Predni-H-injekt^R i.m. injiziert. Eine zweite, gleich große Dosis wurde 1 h vor der Exposition appliziert. Dabei erhielt das Tier zusätzlich 9 mg Pentobarbital-Na (Nembutal^R, 60 mg/ml, Abbott) intraperitoneal und 15 min später noch einmal 4,2 mg intramuskulär. Nachdem eine ausreichende Narkosetiefe erreicht war, wurde dem Hamster der Bauch rasiert, auf den anschließend ein mit Nylontüll bespanntes Plastikröhrchen (10 x 5 cm) mit 16 Aedes vexans-Weibchen gestellt wurde. Der Hamster wurde dazu auf den Rücken gelegt (s. Abbildung 5). Den Mücken war 10 h vor dem Experiment die Kohlehydratnahrung und 1 h vorher auch das Trinkwasser vorenthalten worden.

Der Hamster wurde innerhalb der nächsten 50 min von allen 16 Weibchen, zum Teil mehrmals, gestochen. Dabei saugten sich 13 Tiere voll Blut (Saugantwort 81 %).

Abbildung 5: Aedes vexans bei der Blutmahlzeit am Hamster

Nach 1 h wurden die Mücken von dem Hamster entfernt und bis zum nächsten Tag bei Apfel und Wasser gehalten, anschließend CO_2- getestet (s. Abschnitt 4.2.3) und einzeln bei -70° C eingefroren.

Der Hamster erwachte nach 2,5 h aus der Narkose und wurde bis zum 4. Tag nach der Exposition beobachtet. Krankheitszeichen traten in dieser Zeit nicht auf. 100 h nach der Exposition wurde das Tier in Ethernarkose durch Dekapitieren entblutet und das Blut (verdünnt 10^{-1} mit "Tris 100") auf 9 Babymäuse (2 Tage alt) intrazerebral verimpft. 3 der Versuchstiere starben unter charakteristischen Symptomen nach einer Inkubation von 4 - 7 Tagen (TAHV konnte immunfluoreszenzoptisch in Hirnausstrichpräparaten nachgewiesen werden). Bei einem

Reisolationsversuch (Verdünnung 1 : 1 in "Tris 100") starben nach Verimpfung auf je 2 Würfe 4-5-tägiger Saugmäuse bei intrazerebraler Applikation 100 % (27), bei subkutaner Applikation 74 % (17 von 23) der beimpften Tiere.

Die virologische Untersuchung (Zellkultur und Saugmaus) der vollgesogenen Weibchen ergab eine Infektionsrate von 38 % (5 von 13), was in gutem Einklang mit den Ergebnissen aus Versuch Nr. 4.2.3 am 20. Tag steht (s.Tabelle 4.2.5).

4.2.3 CO_2-Sensitivität bei TAHV-infizierten Aedes vexans

Angeregt durch den Bericht von TURELL & HARDY (1980) über das Auftreten von CO_2-Sensitivität bei verschiedenen Culicidenarten nach Infektion mit California-Encephalitis(CE)Virus wurden Mücken, die eine infektiöse Blutmahlzeit erhalten hatten, auf CO_2-Sensitivität untersucht, bevor sie zur weiteren virologischen Untersuchung kamen.

Die ersten Versuche wurden in Form des "CO_2(warm)-Tests" (s. Abschnitt 3.3.6) an Mücken aus Versuch Nr. 4.2.1 durchgeführt. Wie aus Tabelle 4.2.11 hervorgeht, fanden sich unter 17 infizierten Weibchen 4 sensitive Tiere (= 23,5 %) sowie ein fraglich sensitives. Von 115 nicht infizierten Weibchen war eines fraglich sensitiv.

Tabelle 4.2.11 Ergebnisse des CO_2(warm)-Tests bei Mücken aus Versuch 4.2.1

Für die Blutmahlzeit verwendetes Präparat	Infektionsstatus	CO_2-Status +	±	−
NEW HAVEN	Ø	0	0	46
DÜSSELDORF	Ø	0	0	35
	+	2^a 1^c	1^c	10
PRAG	Ø	0	1^b	33
	+	1^a	0	2

Zeichenerklärung:

Infektionsstatus:
Ø = nicht infiziert
\+ = infiziert

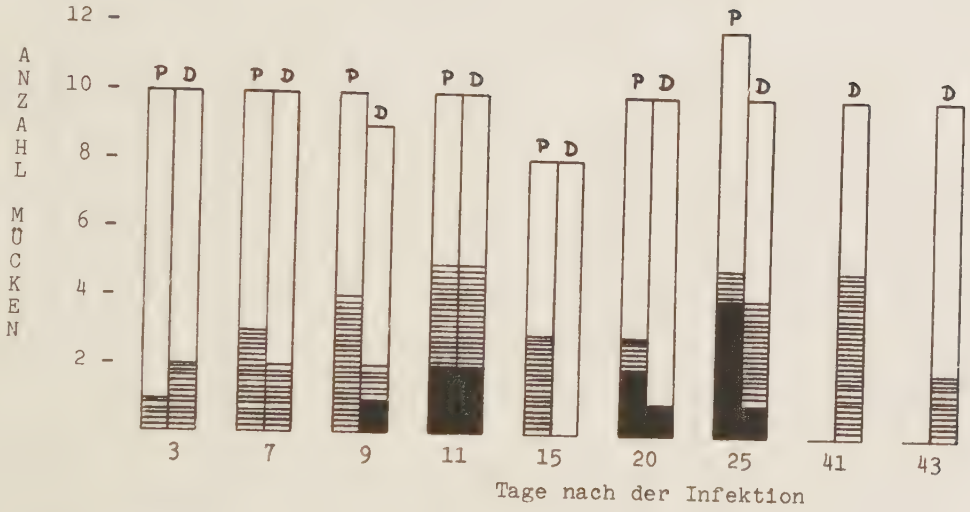
CO_2-Status:
\+ = sensitiv
± = fraglich sensitiv
− = nicht sensitiv

a = beim ersten Test
b = beim zweiten Test
c = beim dritten Test

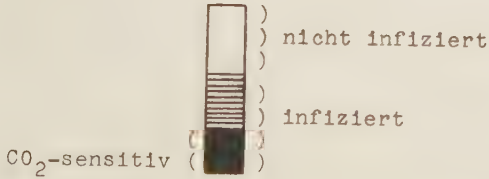
Tabelle 4.2.12 CO_2-Sensitivität bei Mücken aus Versuch 4.2.3 (Exposition bei + 1° C)

Viruspräparat im Futterblut	Tage nach der Blutmahlzeit	Alter der Mücken (Tage)	Infektionsstatus	CO_2-Status +	±	-
PRAG	3	22	Ø	0	0	9
			+	0	0	1
(siehe auch Abbildung 6)	7	26	Ø	0	0	7
			+	0	0	3
	9	28	Ø	0	0	6
			+	0	0	4
	11	30	Ø	0	0	5
			+	2	0	3
	15	34	Ø	0	0	5
			+	0	2	3
	20	39	Ø	0	0	7
			+	2	0	1
	25	44	Ø	0	0	7
			+	4	0	1
DÜSSELDORF	3	22	Ø	0	0	8
			+	0	0	2
(siehe auch Abbildung 6)	7	26	Ø	0	0	8
			+	0	0	2
	9	28	Ø	0	0	7
			+	1	0	1
	11	30	Ø	0	0	5
			+	2	0	3
	15	34	Ø	0	1	8
			+	0	1	0
	20	39	Ø	0	0	9
			+	1	0	0
	25	44	Ø	0	0	6
			+	1	0	3
	41	60	Ø	0	0	5
			+	0	0	5
	43	62	Ø	0	0	8
			+	0	0	2
Gesamt			Ø	0	1	110
			+	13	3	34

Abbildung 6 (zu Tabelle 4.2.12)



Zeichenerklärung



P = PRAG
D = DÜSSELDORF

Mücken, die als fraglich CO_2-sensitiv (±) bewertet wurden, sind nicht berücksichtigt !

In Versuch Nr. 4.2.3 wurden vom 3. bis zum 43. Tag nach der infektiösen Blutmahlzeit insgesamt 161 Weibchen nach der Methode von ROSEN & SHROYER (1981) bei + 1° C CO_2-getestet. Von 50 infizierten Weibchen erwiesen sich 13 (=26 %) als CO_2-sensitiv, weitere 3 als fraglich sensitiv. Von den untersuchten 111 nicht infizierten Weibchen war keines sicher, eines fraglich sensitiv.

Der früheste Fall von CO_2-Sensitivität fand sich am 9. Tag nach der infektiösen Blutmahlzeit, die spätesten Fälle traten am 25. Tag auf. Von den 7 infizierten Weibchen, die am 41. bzw. 43. Tag untersucht wurden, war keines CO_2-sensitiv: Tabelle 4.2.12 und Abbildung 6.

Am 9., 11. und 15. Tag nach der infektiösen Blutmahlzeit wurden außerdem parallel zu den bei + 1° C exponierten Mücken gleich große Gruppen mit dem CO_2(warm)-Test untersucht. Von 20 infizierten Weibchen (bei 60 untersuchten) waren 2 (= 10 %) CO_2-sensitiv, davon eines am 11. Tag (infiziert mit PRAG) und eines am 15. Tag (infiziert mit DÜSSELDORF). In Tabelle 4.2.13 sind die Ergebnisse zusammengefaßt und den entsprechenden Daten aus Tabelle 4.2.12 noch einmal gegenübergestellt.

Tabelle 4.2.13 CO_2(warm)-Test und Exposition bei + 1° C; Vergleich der Ergebnisse (Versuch 4.2.3, am 9., 11. und 15. Tag nach Infektion)

CO_2(warm)-Test			Infektionsstatus	Exposition bei + 1° C		
+	±	-		+	±	-
0	0	40	Ø	0	1	36
2	0	18	+	5	3	14

(Die Daten in der rechten Tabellenhälfte sind aus Tabelle 4.2.12 zusammengefaßt)

Falsch-positive Befunde (CO_2-sensitive Mücken, die nicht infiziert waren) traten bei diesen beiden Versuchen nicht auf.

In Versuch Nr. 4.2.7 wurden bei der Untersuchung auf CO_2-Sensitivität außer den für die Virusübertragung auf den Hamster verwendeten Mücken auch solche untersucht, die Teil eines orientierenden Versuches zur transovariellen Übertragung waren. (Die Ergebnisse dieses Versuches aus der F 1 liegen jedoch noch nicht vor und werden in dieser Arbeit nicht behandelt.) Es wurden insgesamt 165 Weibchen von Aedes vexans 20 Tage nach einer infektiösen Blutmahlzeit (Präparat PRAG, Titer 3,2 log $SMICLD_{50}$) CO_2-getestet. 41 Tiere (= 25,5 %) waren CO_2-sensitiv, eines fraglich sensitiv. Alle CO_2-sensitiven Mücken, die fraglich sensitive sowie 16 nicht CO_2-sensitive Tiere (insgesamt 58) wurden auf ihren Virusgehalt untersucht. Von den 41 CO_2-sensitiven Tieren waren 37 (= 90 %) infiziert, alle anderen untersuchten Mücken waren nicht infiziert. In diesem Versuch waren dementsprechend 4 (= 10 %) falsch-positive Befunde bei der CO_2-Testung zu verzeichnen: Tabelle 4.2.14.

Tabelle 4.2.14 CO_2-Sensitivität bei Mücken aus Versuch 4.2.7 (Exposition bei + 1° C)

Viruspräparat im Futterblut	Tage nach der Blutmahlzeit	Alter der Mücken (Tage)	Infektionsstatus	CO_2-Status +	±	-
PRAG	20	30	Ø	4	1	16*
			+	37	0	0*

* Weitere 107 nicht-CO_2-sensitive Mücken wurden bisher nicht auf ihren Infektionsstatus überprüft.

Tabelle 4.2.15 Zusammenfassung CO_2-Tests: Versuche 4.2.3 und 4.2.7; (Exposition bei + 1° C)

Infektionsstatus	CO_2-Status +	±	-	Mücken untersucht
Ø	4	2	126	132
+	50	3	34	87
Σ	54	5	160	219

5. Diskussion

5.1 Rückadaptation des TAHV an den extraneuralen Passageweg

Die eingangs angesprochene Annahme, daß es sich bei dem Präparat NEW HAVEN um einen Stamm des TAHV mit "neuralen" Eigenschaften handelt, bestätigte sich in allen mit diesem Präparat durchgeführten Versuchen. Insbesondere die verminderte Pathogenität für Babymäuse bei subkutaner Applikation war deutlich zu beobachten: trotz Inokulation hoher Virusdosen (4,1 log $SMICLD_{50}$) wurden Todesfälle bei 5-6-tägigen Tieren weder bei den Vorversuchen noch bei den Versuchen zur Gewinnung von Virus aus extraneuralen Geweben der Babymaus gesehen. Nur bei Verwendung neugeborener (1-2-tägiger) Saugmäuse konnte eine Letalität nach subkutaner Applikation für dieses Präparat festgestellt werden (Tabelle 4.1.5 linke Hälfte), was durch die größere Empfindlichkeit jüngerer Versuchstiere gegenüber der Infektion mit TAHV (MALKOVA, in ROSICKY & MALKOVA, 1980) erklärt ist. Auch hier jedoch erreichte die Pathogenität nicht die gleiche Höhe wie bei intrazerebraler Applikation.

Ein quantitativer Vergleich mit den Ergebnissen anderer Untersucher, von denen der "Index der Invasivität" (DANIELOVA, 1974) bzw. der Marker sc^+ = "Virulenz bei subkutaner Applikation" (MALKOVA, 1971) für verschiedene TAHV-Stämme bestimmt wurde, wäre wegen des unterschiedlichen Alters der verwendeten Mäuse von zweifelhaftem Wert. DANIELOVA beispielsweise benutzte 2-3-tägige, MALKOVA 4-tägige (1971) bzw. 3-tägige (1974) Tiere; in den eigenen Untersuchungen wurden aus den genannten Gründen (Abschnitt 4.1.1) 5-6-tägige Mäuse verwendet.

Daß diese Unterschiede nicht zu vernachlässigen sind, zeigt ein Vergleich der linken und rechten Hälfte von Tabelle 4.1.5: der Altersunterschied von 4 Tagen bewirkt bei den Babymäusen bereits eine merkliche Steigerung der Resistenz gegenüber einer extraneuralen Infektion mit dem TAHV (bei allen untersuchten Stämmen).

Ein weiterer Marker für den neuralen Charakter des Präparates NEW HAVEN ist die mangelhafte Fähigkeit, in der Maus nach subkutaner Applikation eine nennenswerte Virämie zu erzeugen. Tabelle 4.1.1a belegt dies für verschiedene Inkubationszeiten nach Inokulation unterschiedlich hoher Virusdosen. Bei intrazerebraler Applikation dagegen läßt sich eine Virämie von bis zu 3,7 log $SMICLD_{50}$ /0,03 ml feststellen (Tabelle 4.1.1b). Zu ähnlichen Ergebnissen gelangte BARDOS (1965) in einer vergleichbaren Versuchsanordnung.
Auch seine Befunde bei der Untersuchung verschiedener extraneuraler Organe der Babymaus stehen im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit: BARDOS fand geringe Virusmengen in der Milz, jedoch einen höheren Virusgehalt in Lungen- und Muskelgewebe.

Insbesondere der hohe Virusgehalt im Muskelgewebe ist, wie BARDOS ausführt, deshalb von Interesse, weil bei menschlichen TAHV-Infektionen die Patienten häufig über Muskelschmerzen klagen. Eine ähnliche Überlegung stellt JOHNSON (1965) aufgrund der Ergebnisse seiner Versuche mit Sindbis-Virus (Alphavirus-Gruppe) an, bei denen er mit Hilfe fluoreszierender Antikörper die größten Mengen Antigen im Muskelgewebe infizierter Mäuse festellen konnte. Die Pathogenese dieser beiden Virusarten ähnelt sich auch insofern, als von beiden die hervorgerufene Virämie als Plasmavirämie beschrieben wird (JOHNSON, 1965 ; SIMKOVA & WALLNEROVA, 1968), die im Falle des TAHV durch die Virusvermehrung im Muskelgewebe aufgebaut und aufrechterhalten wird (WALLNEROVA, 1969; SCHWANZER, 1969).

Daß nach subkutaner Inokulation des Präparates NEW HAVEN trotz der beobachteten hohen Virustiter im Muskel keine entsprechende Virämie zu beobachten war, spricht dafür, daß bei dieser neuralen Variante des TAHV nicht die primäre Virusvermehrung nach der Inokulation sondern erst der zweite Schritt, die Ausbreitung in Form einer Virämie, gestört ist. Dementsprechend ist auch die Virämie nicht ausreichend, um das ZNS zu infizieren.

Die Versuche, durch serielle extraneurale Passagen eine Rückanpassung des neuralen Stammes NEW HAVEN an die extraneurale Vermehrungsweise - mit hoher Virämie und damit einhergehend hoher Letalität nach subkutaner Verimpfung - zu erreichen, waren, wie die Ergebnisse in den Tabellen 4.1.3, 4.1.5 und 4.1.6 zeigen, erfolgreich. Die Umwandlung zum neuralen Stamm ist also reversibel.

Daß die Anpassung tatsächlich an den extraneuralen Passageweg und nicht etwa nur an die 6-tägige Babymaus oder nur an die subkutane Applikation erfolgte, geht aus den Tabellen 4.1.6 und 4.1.4 hervor: der Stamm DÜSSELDORF verhält sich auch gegenüber dem Hamster bei intramuskulärer Injektion wie der primär extraneural in diesen Tieren vermehrte Stamm PRAG, welcher sich seinerseits gegenüber Babymäusen wie der Stamm DÜSSELDORF verhält.

Die Tatsache, daß sich auch beim Hamster selbst nach Applikation höchster Dosen mit dem Präparat NEW HAVEN praktisch keine Virämie erzeugen ließ, ein bisher in der Literatur nicht benutzter Marker, belegt erneut die neuralen Eigenschaften dieses Stammes.

Eine bemerkenswerte Zwischenposition nimmt in dieser Gegenüberstellung das Präparat "icer-Blut" ein: im Hamster löst es nach i.m. Inokulation eine hohe Virämie aus, während es gegenüber 5-6-tägigen Babymäusen in dieser Hinsicht eine ähnliche Reaktion wie der Stamm NEW HAVEN zeigt (Tabelle 4.1.6 und 4.1.2). Sein intermediärer Charakter wird auch bei der Betrachtung der Pathogenität (Letalität) gegenüber 5-6-tägigen Babymäusen deutlich (Tabelle 4.1.5 rechts), welche zwischen derjenigen von NEW HAVEN einerseits und PRAG und DÜSSELDORF andererseits liegt. Dieser Befund läßt vermuten, daß bei einigen Tieren nach Verimpfung des Präparates "icer-Blut" doch eine Virämie auftritt, die ausreicht, um den zur eigentlich tödlichen Enzephalitis führenden Befall des ZNS zu gewährleisten.

Es stellten sich nun die Fragen,

1. zu welchem Zeitpunkt der Rückadaptation die entscheidenden Schritte zurück zum extraneuralen Stamm aufgetreten sind, und
2. welcher Natur diese Schritte waren.

Die Ergebnisse in Tabelle 4.1.3 sprechen dafür, daß die wichtigsten Veränderungen in der Beschaffenheit des Virusmaterials bereits in der 2. ENP ausgeprägt sind: im Verlaufe der weiteren Passagen sind die Änderungen, was Höhe der Virämie, Inkubationszeit und Auftreten klinischer Symptome angeht, vergleichsweise gering. Daß Todesfälle und Krankheitszeichen erstmals in der 3. ENP auftraten, ist als Resultat der wesentlich höheren Inokulationsdosis zu verstehen.

Immerhin sind nach zehn extraneuralen Passagen mittlere bis hohe Virämietiter schon nach Verimpfung sehr geringer Virusdosen zu einem früheren Zeitpunkt als in den früheren Passagen nachweisbar.

Die Frage, welcher Art die Veränderungen waren, läßt sich aus den vorliegenden Ergebnissen nicht beantworten. Ansgesichts der Geschwindigkeit, mit der sie eingetreten sind, kommen in Frage:

1) eine durch die Art der Inokulation und dementsprechend den Ort der primären Virusvermehrung veränderte Oberfläche des Virus, bedingt durch die Unterschiedlichkeit der Membranen, an denen es seine Hülle erhält ("budding"),

2) eine Veränderung in der genetischen Zusammensetzung der Viruspopulation, bedingt durch den starken Selektionsdruck, der durch die extraneurale Applikation von vornherein ausgeübt wurde.

Für die letztere Hypothese sprechen außer der von MALKOVA (S. 13 in ROSICKY & MALKOVA, 1980) erwähnten Heterogenität unklonierter TAHV-Stämme auch Untersuchungen von SHOPE & BISHOP (unveröffentlicht, zitiert in BISHOP et al., 1980), nach denen Genprodukte des Virus (Envelope-Proteine) für die Virulenz von California-Enzephalitis-Viren bestimmend sind. Für das Sindbis-Virus (Alphavirus) wurden ebenfalls enge Beziehungen zwischen Virulenz einerseits und Envelope-Proteinen (SYMINGTON & SCHLESINGER, 1978) sowie Rezeptoren auf der Wirtszelle (SMITH + TIGNOR, 1980) andererseits gefunden.

Die intermediäre Stellung des Präparates "icer-Blut" wäre in diesem Konzept als Ergebnis eines weniger starken Selektionsdruckes zu verstehen, da die intrazerebrale Applikation noch eine primäre Virusvermehrung im "gewohnten Milieu" erlaubte.

5.2 Das Virus-Vektor-Wirtsystem im Labor

Aus den vorgestellten Ergebnissen der Versuche zum Virus-Vektor-Wirt-System geht hervor, daß der für die Versuche verwendete Laborstamm von Aedes vexans für eine Infektion mit dem TAHV empfänglich ist. Dieser Befund ist aus mehreren Gründen nicht überraschend: die Stechmücke Aedes vexans wurde in dem bisher bestuntersuchten Naturherd des TAHV in Südmähren als Hauptvektor identifiziert (DANIELOVA, S. 40 in ROSICKY & MALKOVA, 1980) und spielt offensichtlich auch in den beiden bisher in Deutschland bekannten Naturherden in Nordbayern und am Mittelrhein eine entscheidende Rolle (SPIECKERMANN & ACKERMANN, 1972 und 1974; MACKENSTEIN, 1983). Zudem stammten die für den Aufbau des Laborstammes verwendeten Wildexemplare von Aedes vexans aus dem Gebiet eines dieser beiden deutschen Naturherde.

Diese Empfänglichkeit ist andererseits aber auch keine Selbstverständlichkeit: auf die genetische Uneinheitlichkeit und Veränderlichkeit gerade von im Labor gehaltenen Stechmücken auch in ihrem Verhalten gegenüber Pathogenen wird schon von CRAIG (1964) hingewiesen. Daß sich die genetische Beschaffenheit des Aedes vexans-Laborstammes gegenüber derjenigen der Wildpopulation geändert hat, geht aus den Arbeiten von SCHULER (1983) und FRIEDERICH (1983) hervor. Über eine unterschiedliche Empfänglichkeit von Wild- und Laborstämmen einer Stechmücke (Culex tarsalis) gegenüber der oralen Infektion mit einem Arbovirus (WEE) berichten HARDY et al. (1976). Angaben über Unterschiede in der Empfänglichkeit gegenüber Arbovirusinfektionen bei Stechmückenstämmen geografisch unterschiedlicher Herkunft finden sich z.B. bei GRIMSTAD et al. (1977), GUBLER & ROSEN (1976) und TESH et al. (1976).

MEYER et al. (1983) verglichen zwei Gruppen von Culex tarsalis von derselben Örtlichkeit in Kalifornien, die sich darin unterschieden, daß die eine Gruppe aus im Freiland in CO_2-geköderten Fallen gefangenen Imagines bestand, die andere schon als Puppen eingesammelt und im Labor großgezogen worden war.

Sie fanden, daß die erste Gruppe für die Infektion sowohl mit St.-Louis Encephalitis-Virus (SLE, Flavivirus) als auch mit Western Equine Encephalitis-Virus (WEE, Alphavirus) empfänglicher war.

Auch die Aufzuchtbedingungen bei der Larvenentwicklung können die Empfänglichkeit für eine Virusinfektion beeinflussen: BAQUAR et al. (1980) stellten eine höhere Empfänglichkeit von Culex tritaeniorhynchus-Weibchen gegenüber der Infektion mit West Nile-Virus (Flavivirus) fest, wenn die Larven mit weniger Nahrung versorgt worden waren.

Die Infektion von Aedes vexans mit dem TAHV gelang indes nicht mit allen daraufhin untersuchten Virusstämmen: nach Verfütterung des Präparates NEW HAVEN ließ sich in keiner einzigen Mücke eine Virusvermehrung nachweisen. Die beiden extraneural vermehrten Virusstämme PRAG und DÜSSELDORF jedoch erwiesen sich als gleich gut geeignet, eine dauerhafte Infektion von Aedes vexans auf dem Wege einer Blutmahlzeit zu bewirken. Im Falle des Präparates PRAG wurde die Infektion bis zum 25. Tage nach der Virusaufnahme verfolgt, im Falle des Präparates DÜSSELDORF sogar bis zum 43. Tage.

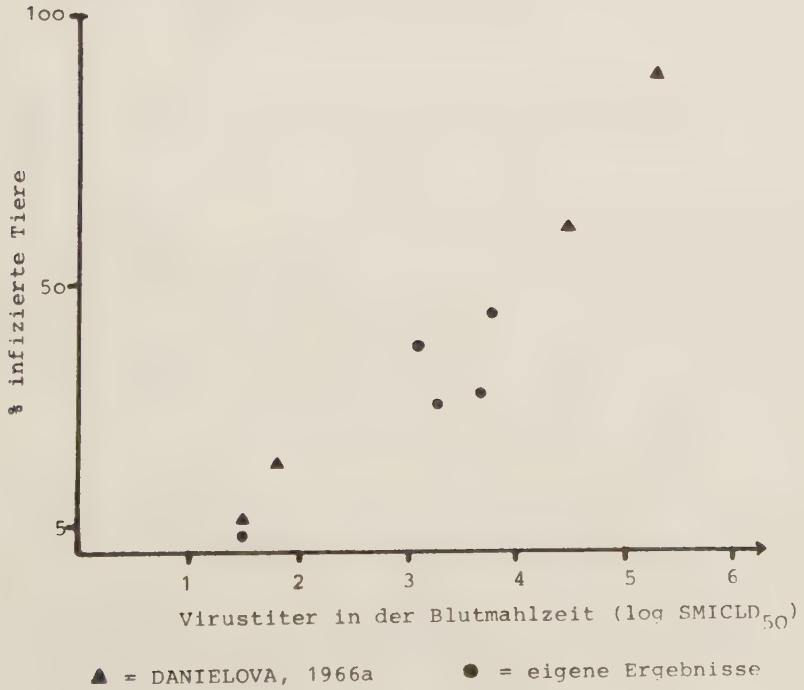
Ein Vergleich der Infektionsraten läßt keine wesentlichen Unterschiede zwischen diesen beiden Stämmen erkennen (dabei ist in Versuch 4.2.1 das Präparat PRAG vom Vergleich auszuschließen, da nicht die vollständigen Mücken untersucht wurden (Tabelle 4.2.1)).

Die in Abhängigkeit vom Virustiter der Blutmahlzeit gefundenen Infektionsraten stehen in guter Übereinstimmung mit den von DANIELOVA (1966a) an Wildmücken ermittelten Werten: der Schwellentiter für die Infektion (das ist der Virustiter in der Blutmahlzeit, der erforderlich ist, um 1-5 % der Mücken zu infizieren, (CHAMBERLAIN et al., 1954)) liegt bei etwa 1,5 log $SMICLD_{50}$. Bei einem Futtertiter von 3,3-3,8 log $SMICLD_{50}$ liegt die Infektionsrate zwischen 27 und 44 %. Eine vergleichende Übersicht mit den Ergebnissen von DANIELOVA gibt Tabelle 5.2.1. Abbildung 7 veranschaulicht diese Tabelle in einer Grafik.

Tabelle 5.2.1 Infektionsraten von Aedes vexans nach Verfütterung von Blutmahlzeiten unterschiedlichen Virusgehaltes

Virustiter der Blutmahlzeit (log $SMICLD_{50}$)	Inkubationszeit (d)	Infektionsrate (%)	Quelle
1,5	10-25	3	eigene Ergebnisse
1,5	13	6,6	DANIELOVA, 1966a
1,8	15	16	DANIELOVA, 1966a
3,1	20	38	eigene Ergebnisse
3,3	10-25	27	eigene Ergebnisse
3,7	12	29	eigene Ergebnisse
3,8	10-25	44	eigene Ergebnisse
4,5	14	60	DANIELOVA, 1966a
5,3	15	88	DANIELOVA, 1966a

Abb. 7 : Grafische Darstellung zu Tabelle 5.2.1



Die Tatsache, daß in Versuch 4.2.1 die Mücken der Gruppe "B" (Ingestion einer minimalen Blutmahlzeit in den Kropf) in ähnlichem Maße infiziert gefunden wurden wie solche der Gruppe "A" (normale Blutmahlzeit), deutet auf die Möglichkeit hin, daß auch das Epithel des ventralen Divertikels (= Kropf) als Eintrittspforte und Ort der primären Virusvermehrung in der Mücke geeignet ist.

Einen weiteren Beleg für die Brauchbarkeit des Aedes vexans-Laborstammes für Untersuchungen mit dem TAHV stellt die erfolgreiche Übertragung des Virus durch diese Mücken auf einen gesunden Hamster dar. Entscheidend ist hier der qualitative Nachweis des TAHV im Blut des Hamsters, quantitative Aussagen (Verlauf und Höhe der Virämie, Übertragungsrate) sind aufgrund der Versuchsanordnung nicht sinnvoll bzw. unmöglich. Virusübertragungsversuche mit infizierten Mücken wurden für das TAHV erfolgreich bisher mit Saugmäusen (z.B. SIMKOVA et al., 1960) und mit Schimpansen (Pan troglodytes) (SIMKOVA & DANIELOVA, 1969) durchgeführt.

An diesen Ergebnissen ist bemerkenswert, daß der sekundär extraneural vermehrte Stamm DÜSSELDORF in der Lage ist, Aedes vexans per os zu infizieren, der neural vermehrte Elternstamm NEW HAVEN dagegen nicht. Das bedeutet, daß die Rückanpassung an den extraneuralen Passageweg nicht nur, wie dies der Versuchsmethodik entsprach, eine Steigerung der Virulenz gegenüber dem Wirtstier zur Folge hatte, sondern gleichzeitig damit auch ein erhöhte Infektiosität für die Vektormücke. Dies deutet auf eine enge funktionelle Verknüpfung dieser beiden biologisch wichtigen Eigenschaften hin.

Es stellt sich nun die Frage, warum sich die Stechmücken mit dem Präparat NEW HAVEN nicht infizieren ließen. Der Befund steht in Einklang mit Ergebnissen von DANIELOVA (1968), die zu dem Schluß kommt, daß sich ein neural vermehrtes Präparat in der Mücke schlechter vermehrt als ein extraneural vermehrtes. Die Beurteilung wird jedoch erschwert durch ein ebenfalls schon von DANIELOVA (1968) beobachtetes Phänomen:

aus einer Blutmahlzeit, die mit Babymausgehirnsuspension als Virusanteil zubereitet wurde, nimmt die Mücke weniger Virus auf als aus einer Blutmahlzeit, die das Virus in Form virämischen Blutes enthält. DANIELOVA fand den Virusgehalt der Mücken bei Verwendung der Gehirnsuspension um 3,5 log $SMICLD_{50}$ niedriger als den Titer der Blutmahlzeit.

Bei Verwendung des extraneuralen Stammes "236" in Form virämischen Blutes betrug dieser Unterschied nur 1,5-2,0 log $SMICLD_{50}$. In unseren eigenen Untersuchungen (s. Tabelle 4.2.10) betrugen die entsprechenden Differenzen 2,4 und 1,2 log $SMICLD_{50}$. (Der geringe Virusgehalt pro Mücke, der in Versuch Nr. 4.2.2 einen Tag nach der infektiösen Blutmahlzeit beobachtet worden war (Tabelle 4.2.3), ist in dieser Hinsicht nicht aussagekräftig: es hätte sich um die von DANIELOVA (1962) für diesen Zeitpunkt beschriebene Phase der Viruseklipse handeln können.) Eine Differenz von etwa 1 log $SMICLD_{50}$ ist rein rechnerisch zu erwarten, da die Mücke nur etwa 0,003 ml Blut zu sich nimmt, also ein Zehntel des für die Titration verwendeten Bezugsvolumens (0,03 ml) (CLEMENTS, 1963). Die im Falle des neuralen Stammes gefundene Differenz von 2,4 log $SMICLD_{50}$ ist dadurch nicht mehr erklärt.

Die Versuche 4.2.5 und 4.2.6, in denen nach Gründen für diesen Unterschied gesucht wurde, brachten keine eindeutige Klärung. Bei der Untersuchung der verschiedenen Phasen einer frisch zubereiteten infektiösen Blutmahlzeit (Versuch 4.2.5, Tabelle 4.2.9) stellte sich heraus, daß ein Teil des infektiösen Materials bei Verwendung einer lyophilisierten Gehirnsuspension an sedimentierende Partikeln gebunden ist. So erklärt sich der Unterschied im Virusgehalt des Zellsedimentes, der auftritt, wenn die infektiöse Gehirnsuspension vor Zumischung zum Blut durch ein Filter mit 0,2 µm Porenweite filtriert wird. Der Serumanteil enthält jedoch in jedem Falle eine dem Gesamtvirustiter der Blutmahlzeit entsprechende Infektiosität. Diese Tatsache macht es unwahrscheinlich, daß die Mücke nur deshalb daran gehindert wird, das Virus aufzunehmen, weil ein Teil der Infektiosität an grobpartikuläre Reste von Gehirnmaterial gebunden ist.

Andererseits konnte in Versuch 4.2.6 durch mechanische Verfahren (Filtration und Ultraschallzerkleinerung der Blutmahlzeit) eine Überwindung der Minderaufnahme erreicht werden (Tabelle 4.2.10). Dieser letztgenannte Versuch wurde mit der Überlegung durchgeführt, solches Virusmaterial für die Aufnahme durch die Mücke aufzuschließen, welches unter Umständen in nur relativ kleinen Virus-Erythrozyten-Aggregaten "gefangen" sein könnte: schon Aggregate von 3 oder 4 Erythrozyten würden den Mückenrüssel, welcher eine lichte Weite von etwa 10 bis 15 µm besitzt, nur schwer passieren können. Infizierte Mücken wurden allerdings auch bei Verfütterung einer solchermaßen vorbehandelten Blutmahlzeit mit dem Präparat NEW HAVEN nicht gefunden (13 untersuchte Mücken nach 10 Tagen Inkubationszeit).

Das Versagen des Stammes NEW HAVEN hinsichtlich der Infekton der Vektormücke Aedes vexans per os in den geschilderten Versuchen ist dementsprechend am ehesten als Resultat zweier Faktoren, deren anteilmäßige Bedeutung noch zu klären bleibt, zu verstehen: sowohl einer geringeren Vermehrungsfähigkeit dieses Virusstammes in der Mücke (entsprechend einer höheren Infektionsschwelle) als auch einer geringeren Virusaufnahme aus der Blutmahlzeit (wodurch das Erreichen dieser Schwelle erschwert wird).
Die Ursache für diese geringere Virusaufnahme konnte bisher nicht geklärt werden, hierzu sind weitere Versuche (z.B. Verfütterung filtrierter Virussuspension in reinem Blutserum) nötig.

Sollte sich die beschriebene Minderaufnahme von Virus aus Blutmahlzeiten, die mit virushaltiger Gehirnsuspension zubereitet wurden, als ein Phänomen erweisen, das auch bei anderen Virus/Vektor-Kombinationen auftritt, würde sich hier möglicherweise eine weitere Erklärungsmöglichkeit für Versuchsanordnungen ergeben, in denen vergeblich versucht wurde, Stechmücken mit bestimmten Viren im Labor per os zu infizieren, obwohl ihre Rolle als Vektoren für diese Viren aus ökologischen Daten gut belegt ist.

Als Beispiel ist hier Culiseta melanura zu erwähnen, die in Connecticut/USA als Hauptvektor des Flanders-Virus (Rhabdoviridae) betrachtet wird, jedoch im Labor nicht per os (wohl aber durch intrathorakale Injektion) mit diesem Virus infiziert werden konnte, obwohl die Blutmahlzeit mehr als 4 log $SMICLD_{50}$ des Virus enthielt. Die Blutmahlzeit war ebenfalls durch Mischung von infektiöser Gehirnsuspension mit defibriniertem Blut (Huhn) hergestellt worden (HILDRETH, 1978). -

Die eigenen Versuche zur Infektion von Culex pipiens mit TAHV (Versuch 4.2.4) wurden angesichts uneinheitlicher Ergebnisse in der Literatur durchgeführt. So berichtet PCHELKINA (Moskau, 1978) von Experimenten, in denen das TAHV (neuraler Stamm "92") bis zu 42 Tagen nach einer infektösen Blutmahlzeit (Titer 5 log $SMICLD_{50}$) in Weibchen von Culex pipiens molestus nachweisbar war und führt dies auf passives Überdauern des Virus zurück, obwohl auch Übertragungsexperimente auf Mäuse mit derselben Art (25 Tage nach per os-Infektion an einem virämischen Wirt (Maus)) positiv ausfielen. 10 Tage nach einer Blutmahlzeit (Titer 3,0 log $SMICLD_{50}$) fand PCHELKINA in 1 von 5 Weibchen von Culex pipiens TAHV. Demgegenüber verliefen Infektionsversuche mit Culex pipiens von DANIELOVA (1966b) (durch Blutmahlzeiten, Titer 2,0-4,5 log $SMICLD_{50}$, extraneuraler Stamm "236") bei 67 untersuchten Exemplaren negativ (Inkubationszeit 10-21 Tage). Aus Wildexemplaren von Culex pipiens wurde das TAHV bisher erst einmal im Donaudelta (Rumänien) isoliert (ARCAN, 1974).

In unserem eigenen Versuch ließ sich Culex pipiens nicht mit TAHV infizieren (Stämme PRAG und DÜSSELDORF). Es ist jedoch insgesamt nicht ausgeschlossen, daß die unterschiedlichen Ergebnisse auf einer unterschiedlichen Empfänglichkeit geografisch verschiedener Stämme von Culex pipiens beruhen: DANIELOVA benutzte Stämme aus verschiedenen Gegenden der Tschechoslowakei, die eigenen Versuche wurden mit einem Culex pipiens-Stamm aus Indien durchgeführt. PCHELKINA macht über die Herkunft seiner Versuchstiere leider keine Angaben.

Für das Virus der westlichen Pferdeenzephalitis (WEE, Alphavirus) und Culex pipiens ist eine solche Situation bereits bekannt, und es wird versucht, virusrefraktäre Stämme von Culex pipiens zur Einschränkung der Viruszirkulation im Freiland einzusetzen (HARDY et al., 1980).

Die Bestimmung des Virustiters in den Blut/Virusgemischen nach unterschiedlich langer Aufbewahrung bei Raumtemperatur diente ursprünglich zur Kontrolle darüber, ob in der Zeit vom Ansetzen des Gemisches bis zur Beendigung der Fütterung ein wesentlicher Verlust an Infektiosität zu erwarten war. Dies ist nicht der Fall, was den Erfahrungen anderer Autoren mit dieser Fütterungsmethode entspricht (z.B. SIMKOVA et al., 1960; PENNY & TAYLOR, 1969; BEATY & THOMPSON, 1978).

Der beobachtete geringe Abfall der Infektiosität bei der anschließenden Verlängerung der Aufbewahrungszeit bis zu 96 h nach Ende der Fütterung (Tabelle 4.2.4 und 4.2.7) spricht für die hohe Stabilität des Virus in einem serumeiweißreichen Milieu (defibriniertes Blut), eine für Arboviren charakteristische Eigenart (CHAMBERLAIN, 1968). Als Anhalt für ein mögliches passives Überdauern des Virus in der Mücke können diese Ergebnisse jedoch nicht benutzt werden, da die von der Mücke aufgenommene Blutmahlzeit am 4. oder 5. Tag nach der Fütterung zumeist vollständig verdaut ist. Als Inkubationszeit, die ein passives Überdauern in der Mücke mit Sicherheit ausschließt, gibt DANIELOVA (1966b) einen Zeitraum von 8 Tagen an, so daß eine aktive Vermehrung der Stämme PRAG und DÜSSELDORF in diesem Aedes vexans-Stamm als gesichert anzusehen ist.

5.3 CO_2 -Sensitivität bei Aedes vexans durch das TAHV

Die in Abschnitt 4.2.3 dargestellten Befunde erweitern die Tabelle 1.5.1 um ein neues Bunyavirus/Culiciden-Paar: auch bei mit TAHV infizierten Weibchen von Aedes vexans tritt nach einer entsprechenden Inkubationszeit CO_2-Sensitivität auf. Bei insgesamt 60 Exemplaren waren nach Inkubationszeiten zwischen 9 und 25 Tagen die charakteristischen, von TURELL & HARDY (1980) beschriebenen Symptome zu beobachten: Im typischen Fall lag die Mücke auch nach zweistündiger Erholungszeit nach der CO_2-Exposition noch regungslos auf dem Rücken und ließ sich auch durch mehrfaches Berühren nicht aufscheuchen. Daß das Tier überhaupt noch lebte, war oft nur daran zu erkennen, daß es gelegentlich die Mundwerkzeuge und die Antennen sowie die Spitze des Abdomens hin und her bewegte. Manchmal waren einzelne Tiere (als $\pm$ = "fraglich sensitiv" bewertet) in der Lage, sich - zum Teil nur vorübergehend - aufzurichten und auch einige Schritte zu gehen; sie waren jedoch meist durch Berührung oder Rütteln am Käfig wieder aus dem Gleichgewicht zu bringen.

Die Effektivität des Verfahrens, d.h. die Häufigkeit, mit der eine Mücke anhand ihrer CO_2-Sensitivität als infiziert erkannt werden konnte, war bei den beiden benutzten Methoden (CO_2(warm)-Test und Methode nach ROSEN & SHROYER) unterschiedlich. Die Tabelle 4.2.13 zeigt, daß die CO_2-Exposition bei + 1° C derjenigen bei Raumtemperatur zur Bestimmung der CO_2-Sensitivität überlegen ist, wie dies von ROSEN 1980 bereits betont wird. Die beiden Kollektive sind mit 33 % bzw. 27 % infizierten Exemplaren bei 60 bzw. 59 untersuchten Weibchen gut vergleichbar, jedoch wurden mit der Exposition bei + 1° C mehr als doppelt soviele CO_2-sensitive Exemplare entdeckt wie mit der Exposition bei Raumtemperatur.

Die hohen Grade von Übereinstimmung zwischen Infektionsstatus und CO_2-Status von fast 100 %, wie sie von ROSEN (1980) und TURELL & HARDY (1980) berichtet werden, wurden allerdings mit keiner der beiden Methoden erreicht. Die genannten Autoren benutzten jedoch meist die intrathorakale Injektion als Infektionsmethode; in den wenigen Fällen, in denen eine Infektion über eine virushaltige Blutmahlzeit erreicht wurde, wurde die CO_2 -Sensitivität ebenfalls seltener beobachtet (5 von 9 = 55 % bei Aedes melanimon, infiziert mit California-Encephalitis-Virus (CEV), TURELL & HARDY, 1980). Bei den eigenen Untersuchungen waren insgesamt maximal 57 % (50 von 87) der infizierten Mücken tatsächlich CO_2-sensitiv.

Die Zuverlässigkeit der Methode, d.h. die Wahrscheinlichkeit, daß eine CO_2-sensitive Mücke auch wirklich infiziert ist, lag dagegen mit insgesamt 93 % (56 von 60) sehr hoch. Die 4 falsch-positiven Befunde (Tabelle 4.2.14) wurden bei Tieren erhoben, die älter als 4 Wochen waren, was nach ROSEN & SHROYER (1981) bereits die Beurteilung infolge unspezifischer "Altersschwäche" erschwert.

Die Aussagekraft des Befundes "fraglich sensitiv" (+) war mit 63 % (7 infiziert von 11) wesentlich geringer, obwohl auch in dieser Gruppe infizierte Mücken häufiger zu finden sind als im Gesamtkollektiv.

Eine praktische Bedeutung dieser Prüfungsmethode liegt auf der Hand: in bestimmten Untersuchungen, in denen aufwendige Verarbeitungstechniken angewandt werden sollen (z.B. Elektronenmikroskopie), und nur solche Mücken von Interesse sind, die sicher infiziert sind, kann eine Beschränkung auf CO_2-sensitive Exemplare einen großen Teil fruchtloser Arbeit ersparen. Es handelt sich sozusagen um eine zerstörungsfreie Versuchsgutprüfung.

Die Beurteilung, ob es sich bei der beobachteten CO_2-Sensitivität um ein im Ablauf der Infektion zeitlich begrenzt auftretendes Phänomen handelt, wie dies von TURELL & HARDY (1980) für das CEV in Aedex melanimon und Aedes dorsalis angegeben wird, läßt sich aus den vorliegenden Ergebnissen nicht vornehmen. Immerhin ist bemerkenswert, daß von den 7 infizierten Mücken, die am 41./43. Tag nach der Infektion CO_2-getestet wurden, keine einzige CO_2-sensitiv war. Für eine sichere Aussage ist diese Zahl jedoch noch zu klein.

Die Physiologie der CO_2-Sensitivität ist bis heute ungeklärt. Ob die für den Fall der CO_2-Sensitivität bei Drosophila melanogaster gesicherte Beziehung zwischen einer Infektion des Thorakalganglions und dem Auftreten des Syndroms (BUSSEREAU, 1973a + b) auch für mit Rhabdoviren oder Bunyaviren infizierte Culiciden zutrifft, steht nicht fest. Hierzu wäre eine genauere Kenntnis des Infektionsablaufes im Nervensystem der Mücke wünschenswert. Für das TAHV liegt hierzu nur ein einziger Befund von DANIELOVA (1968) vor, die geringe Mengen des Virus 13 Tage nach oraler Infektion in Ganglien von Aedes vexans nachweisen konnte.

BEATY & THOMPSON konnten das ebenfalls zur California-Gruppe zählende LaCrosse-Virus (LAC) regelmäßig in verschiedenen Ganglien von Aedes triseriatus bis zum 35. Tag nach oraler Infektion (1978) und ebenfalls bei transovariell infizierten Tieren nachweisen (1976).

Hier sind weitere detaillierte Untersuchungen zur Pathogenese erforderlich, beispielsweise solche mit Hilfe der Immunfluoreszenz an ganzen Organen oder Gefrierschnitten infizierter Mücken, sowie elektronenoptische Studien. Einige praktische Voraussetzungen für solche weiterführenden Untersuchungen im hiesigen Viruslabor wurden mit der vorliegenden Arbeit geschaffen.

6. Zusammenfassung

Ein seit 1974 im Labor gehaltener Stamm von Aedes vexans (Meigen) (aus dem Institut für Genetik/Universität Mainz) wurde auf seine Empfänglichkeit für eine Infektion mit dem Tahyna-Virus (Bunyaviridae, California Encephalitis-Gruppe) nach oraler Virusaufnahme untersucht.

Hierzu wurde zunächst ein neuraler Stamm des TAHV ("NEW HAVEN", Stamm "92", 13. Babymausgehirnpassage) durch serielle extraneurale Passagen in 5-6 Tage alten Babymäusen an den extraneuralen Passageweg rückadaptiert, da mit dem Elternstamm in den genannten Tieren nach subkutaner Verimpfung keine ausreichende Virämie zu erzeugen war. In einem Vergleich mit dem Elternstamm und einem primär extraneuralen Stamm ("PRAG", Stamm "236", 14. Blutpassage) des TAHV verhielt sich dieser Stamm "DÜSSELDORF" (5.-7. Blutpassage) wie der Stamm PRAG bezüglich folgender biologischer Eigenschaften: bei 5-6 Tage alten Mäusen und bei Hamstern rief er nach subkutaner bzw. intramuskulärer Inokulation eine hohe Virämie (3-5 log $SMICLD_{50}$) hervor und zeigte für 5-6 Tage alte Mäuse eine ausgeprägte Letalität nach subkutaner Applikation.
Die Entwicklung zum neuralen Stamm, der diese Eigenschaften vermissen läßt, ist also reversibel. Der Stamm DÜSSELDORF wurde daher als "sekundär extraneural" bezeichnet.

Nach Verfütterung der drei Virusstämme in Blut/Virus-Gemischen auf Zellstofftupfern erwiesen sich die Weibchen von Aedes vexans als empfänglich für eine Infektion mit den Stämmen PRAG und DÜSSELDORF, jedoch nicht mit dem Stamm NEW HAVEN. Die Infektionsschwelle für den Stamm DÜSSELDORF lag im Bereich von 1,5 log $SMICLD_{50}$/0,03 ml Blut. Infizierte Mücken wurden bis zum 43. Tag nach der infektiösen Blutmahlzeit mit Hilfe der indirekten Immunfluorenszenz in Deckglaszellkulturen (GMK-Zellen) und durch Verimpfung auf Saugmäuse nachgewiesen. Unter den mit TAHV infizierten Weibchen von Aedes vexans zeigten einige (max. 57 %) CO_2-Sensitivität.

Daß die Mücken mit dem Stamm NEW HAVEN nicht infiziert werden konnten, wird sowohl auf eine verringerte Vermehrungsfähigkeit dieses Stammes in der Mücke als auch darauf zurückgeführt, daß die Mücken aus der Blut/Hirnsuspensions-Mischung weniger Virus aufnehmen als aus einer Blut/Blut-Mischung. Die Ursache für dieses letztgenannte Phänomen konnte bisher nicht geklärt werden.

Ein Übertragungsversuch auf einen Hamster mit Aedes vexans am 19. Tag nach einer infektiösen Blutmahlzeit (Stamm PRAG) war erfolgreich.

Der untersuchte Laborstamm von Aedes vexans ist daher für weitere Untersuchungen über die Beziehung zwischen dieser Stechmücke und dem Tahyna-Virus geeignet.

7. Literaturverzeichnis

ACKERMANN, R. (1970)

Über die Verbreitung von Viren der California Encephalitis-Gruppe in der BRD

Dtsch. Med. Wochenschr. 95: 1507

ARCAN, P.; TOPCIN, V.; ROSIN, N.; CSAKY, N. (1974)

Isolation of Tahyna virus from Culex pipiens mosquitoes in Romania

Acta Virol. 18: 175

ASPÖCK, H.; KUNZ, C. (1966)

Isolierung des Tahyna-Virus aus Stechmücken in Österreich

Arch. ges. Virusforschung 18: 8-15

ASPÖCK, H.; KUNZ, C. (1967)

Untersuchungen über die Ökologie des Tahyna-Virus

Zentralbl. Bakteriol. Orig. A: 203: 1-24

ASPÖCK, H.; GRAEFE, G.; KUNZ, C. (1971)

Untersuchungen über die Periodizität des Auftretens von Tahyna- und Calovo-Virus

Zentralbl. Bakteriol. Orig. A, 217: 431-440

BAQUAR, S.; HAYES, C.G.; AHMED, T. (1980)

The effect of larval rearing conditions and adult age on the susceptibility of Culex tritaeniorhynchus to infection with West Nile Virus

Mosq. News 40: 165-171

BARDOS, V. (1961)

The Tahyna Virus I: Study of its resistance to the action of some physical factors and chemical agents

Acta Virol. 5: 50-56

BARDOS, V. (1965)

Tahyna virus in experimentally infected white mice

Acta virol. 9: 358-366

BARDOS, V.; DANIELOVA, V. (1959)

The Tahyna Virus, a virus isolated from mosquitoes in Czechoslovakia

J. Hyg. Epidemid. Microbiol. Immunol. 3: 264-276

BARDOS, V.; PESKO, J. (1981)

Biological and antigenic variants among Tahyna virus strains isolated in Czechoslovakia

Arch. Virol. 68: 65-71

BARDOS, V.; RYBA, J.; HUBALEK; Z. (1975)

Isolation of Tahyna virus from field collected Culiseta annulata larvae

Acta virol. 19: 446

BEATY, B.J.; THOMPSON, W.H. (1976)

Delineation of LaCrosse virus in devolopmental stages of transovarially infected Aedes triseriatus

Am. J. Trop. Med. Hyg. 25: 505-512

BEATY, B.J.; THOMPSON, W.H. (1978)

Tropisms of LaCrosse virus in Aedes triseriatus following infective blood meals

J. med. Entomol. 14: 499-503

BERGE, T.O. (1975)

International Catalogue of Arboviruses

Publ. No. CDC 75-8301, U.S. Dept. of Health, Education and Welfare; Atlanta, Georgia

BISHOP, D.H.L.; CALISHER, C.H.; CASALS, J; CHUMAKOV, M.P.; GAIDAMOVICH, S.YA.; HANNOUN, C.; LVOV, D.K.; MARSHALL, I.D.; OKER-BLOM, N.; PETTERSSON, R.F.; PORTERFIELD, J.S.; RUSSELL, P.K.; SHOPE, R.E; WESTAWAY, E.G. (1980)

Bunyaviridae

Intervirology 14: 125-143

BRUMMER-KORVENKONTIO, M.; SAIKKU, P.; KORHONEN, P.; ULMANEN, I. REUNALA, F.; KARVONEN, J. (1973)

Arboviruses in Finland IV. Isolation and characterization of Inkoo virus, a Finnish representative of the California group

Am. J. Trop. Med. Hyg. 22: 404-413

BRUN, G.; PLUS, N. (1980)

The viruses of Drosophila

in: The Genetics and Biology of Drosophila Vol. 2d hrsg. von Ashburner & Wright; S. 625-702

Academic Press, London

BUSSEREAU, F. (1970a)

Étude du symptôme de la sensibilité au CO_2 produit par le virus Sigma chez la drosophile
I. Influence du lieu d'inoculation sur le délai d'apparition du symptôme

Ann. Inst. Past. 118: 367-385

BUSSEREAU, F. (1970b)

Étude du symptôme de la sensibilité au CO_2 produit par le virus Sigma chez la drosophile
II. Evolution comparée du rendement des centres nerveux et de divers organes après inoculation dans l'abdomen et dans le thorax

Ann. Inst. Past. 118: 626-645

CASALS, J. (1962)

Immunological relationship between Tahyna and California Encephalitis viruses

Acta Virol. 6: 140-143

CHAMBERLAIN, R.W. (1968)

Arboviruses, the Arthropod-Borne Animal Viruses

Curr. Top. Microb. + Immunol. 42: 38-58

CHAMBERLAIN, R.W.; SIKES, R.K.; NELSON, D.B.; SUDIA, W.D. (1954)

Studies on the North-American arthropod-borne encephalitides
VI. Quantitative determination of virus-vector relationships

Amer. J. Hyg. 60: 278-285

CHAMBERLAIN, R.W., SUDIA, W.D. (1961)

Mechanism of transmission of viruses by mosquitoes

Ann. Rev. Ent. 6: 371-390

CHIPPEAUX, A.; RAGEAU, J.; MOUCHET, J. (1970)
The hibernation of Tahyna in Culex modestus (Fic.) in France
C.R. Acad. Sci. (D) Paris 270: 1648-1650

CLEMENTS, A.N. (1963)
The Physiology of Mosquitoes
MacMillan Company, N.Y.

CRAIG, G.B. Jr. (1964)
Applications of genetic technology to mosquito rearing
Bull. WHO 31: 469-473

DANIELOVA, V. (1962)
Multiplication dynamics of Tahyna virus in different body parts of Aedes vexans mosquito
Acta virol. 6: 227-230

DANIELOVA, V. (1966a)
Quantitative relationship of Tahyna virus and the mosquito Aedes vexans
Acta virol. 10: 62-65

DANIELOVA, V. (1966b)
The relation of the virus Tahyna to some species of mosquitoes of the genera Aedes, Culex and Anopheles
Folia parasitol. 13: 97-103

DANIELOVA, V. (1968)
Penetration of the Tahyna virus to various organs of the Aedes vexans mosquito
Folia parasitol. 15: 87-91

DANIELOVA, V. (1974)
The property changes of two Tahyna virus strains by influence of serial passages in various environments
Zentralbl. Bakteriol. Orig. A, 229: 323-333

DANIELOVA, V.; MINAR, J.; ROSICKY, B. (1968)

Experimental survival of the virus Tahyna in hibernating mosquitoes Theobaldia annulata (Schrk.)

Folia parasitol. 15: 183-187

DANIELOVA, V.; MINAR, J.; RYBA, J. (1970)

Isolation of Tahyna virus from mosquitoes Culiseta annulata (Schrk. 1776)

Folia parasitol. 17: 281-284

DANIELOVA, V.; RYBA, J. (1979)

Laboratory demonstration of transovarial transmission of Tahyna virus in Aedes vexans and the role of this mechanism in overwintering of this arbovirus

Folia parasitol. 26: 361-366

DAVIS, B.D.; DULBECCO, R.; EISEN, H.N.; GINSBERG, H.S. (Hrsg.) (1980)

Microbiology (3rd ed.)

Harper & Row, Internat. Ed.

FRIEDERICH, P. (1983)

Beiträge zur Genetik und Verhaltensphysiologie der Stechmücke Aedes vexans (Meigen)

Diss. Institut f. Genetik, Joh.-Gutenberg-Universität, Mainz

GRIMSTAD, P.R.; CRAIG, G.B. Jr.; ROSS, Q.E.; YUILL, T.M.; (1977)

Aedes triseriatus and LaCrosse virus: geographic variation in vector susceptibility and ability to transmit

Am. J. Trop. Med. Hyg. 26: 990-996

GUBLER, D.J.; ROSEN, L. (1976)

Variation among geographic strains of Aedes albopictus in susceptibility to infection with Dengue viruses

Am. J. Trop. Med. Hyg. 25: 318-325

HARDY, J.L.; REEVES, W.C.; SJOGREN, R.D. (1976)
Variations in the susceptibility of field and laboratory populations of Culex tarsalis to experimental infection with Western Equine Encephalomyelitis virus
Am. J. Epidem. 103: 498-505

HARDY, J.L.; HOUK, E.J.; KRAMER, L.D.; Meyer, R.P. (1980)
Mosquitoes as carriers of viral diseases
Calif. Agric. 34: 8

HILTY, M.D.; HAYNES, R.E.; AZIMI, P.H.; CRAMBLETT, H.G: (1972)
California encephaltis in children
Am. J. Dis. Child. 124: 530-533

HORSFALL, W.R.; FOWLER, H.W. Jr.; MORETTI, L.J.; LARSEN, J.R. (1973)
Bionomics and Embryology of the Inland Floodwater Mosquito Aedes vexans
Univ. of Illinois Press, Urbana Ill.

HUFF, C.G. (1931)
A proposed classification of disease transmissions by arthropods
Science 74: 456-457

ISING, E. (1971)
Provisorische Klimaräume zur Laborzucht von Stechmücken I. Mitteilung: Eine Klimakammer zur Verwendung in geschlossenen Räumen
Zeitschrift f. angew. Zoologie 58: 455-464

ISSEL, C.J.; PANTUWATANA, S.; YUILL, T.M.; HANSON, R.P. (1975)
Selection for plaque variants of two California group arboviruses (JTC and LAC) by passage in natural vertebrate hosts
Acta virol. 19: 318-326

JANBON, M.; BERTRAND, A.; HANNOUN, C.; MANDIN, J.; JANBON, F.; JOURDAN, J. (1974)

Méningo-encéphalite à virus Tahyna

J. med. Montpellier 9: 7-10

JOHNSON, R.T. (1965)

Virus invasion of the central nervous system. A study of Sindbis virus infection in the mouse using fluorescent antibody

Am. J. Path. 46: 929-938

KÄRBER, G. (1931)

Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Path. Pharmak. 162: 480-483

KRIEG, A. (1973)

Arthropodenviren

Georg Thieme Verlag, Stuttgart

L'HERITIER, Ph.; TEISSIER, G. (1937)

Une anomalie physiologique héréditaire chez la Drosophile

C.R. Acad. Sci. 205: 1099

MACKENSTEIN, H. (1983)

Zum Vorkommen des Tahyna-Virus in Stechmücken Mitteleuropas

Diss. Med. Inst. f. Umwelthygiene d. Univ. Düsseldorf (in Vorbereitung)

MALKOVA, D. (1971a)

Thermosensitivity of Tahyna virus

Acta virol. 15: 309-315

MALKOVA, D. (1971b)

Virulence of Tahyna virus in mice and its relation to thermosensitivity and character of plaque population markers

Acta virol. 15: 473-378

MALKOVA, D. (1974)
Comparative Study of two variants of Tahyna virus
Acta virol. 18: 407-415

MALKOVA, D.; MARHOUL Z. (1971)
Plaquing of different strains of Tahyna virus in GMK-cells
Acta virol. 15: 227-232

MALKOVA, D.; REDDY, G.N. (1975)
Influence of early passages on the character of freshly isolated strains of Tahyna virus
Acta virol. 19: 333-339

MEYER, R.P.; HARDY, J.L.; PRESSER, S.B.; BRUEN, J.P. (1983)
Comparative arboviral susceptibility of female Culex tarsalis (Diptera: Culicidae) collected in CO_2-baited traps and reared from field-collected pupae
J. Med. Entomol. 20: 56-61

MOHRIG, W. (1969)
Die Culiciden Deutschlands. Untersuchungen zur Taxonomie, Biologie und Ökologie der einheimischen Stechmücken
Parasitologische Schriftenreihe No. 18
Gustav Fischer, Jena

MONATH, T.P.; (1979)
Arthropod-borne encephalitides in the Americas
Bull. WHO 57: 513-533

MOREAU, J.P.; BIHAN FAOU, P.; SINEGRE, G. (1976)
Essais de transmission transovarienne du virus Tahyna chez Aedes caspius (Pallas 1771)
Méd. Trop. 36: 441-442

PCHELKINA, A.A.; SELEDTSOV, I.I. (1978)
Experimental studies on Tahyna virus relationships with mosquitoes (in Russisch)
Medskaya Parazit. 47: 59-63

PENNY, R.E.; TAYLOR, D.J. (1969)

Penetration of Keystone virus in artificially infected female Aedes infirmatus

J. Med. Entomol. 6: 81-82

PORTERFIELD, J.S. (1961)

Studies with Tahyna Virus

Acta Virol. 5: 274

PORTERFIELD, J.S.; CASALS. J.; CHUMAKOV, M.P.; GAIDAMOVICH, S.Ya.; HANNOUN, C.; HOLMES, I.H.; HORZINEK, M.C.; MUSSGAY, M.;OKER-BLOM, N.; RUSSELL, P.K. (1975/76)

Bunyaviruses and Bunyaviridae

Intervirology 6: 13-24

ROSEN, L. (1980)

Carbon dioxide sensitivity in mosquitoes infected with Sigma, Vesicular Stomatitis and other Rhabdoviruses

Science 207: 989-991

ROSEN, L. (1981)

Transmission transovarienne des arbovirus par les moustiques

Med. Trop. 41: 23-29

ROSEN, L.; SHROYER, D.A. (1981)

Natural carbon dioxide sensitivity in mosquitoes caused by a hereditary virus

Ann. Virol. (Inst. Pasteur) 132 E: 543-548

ROSICKY, B.; MALKOVA, D. (Hrsg.) (1980)

Tahyna virus natural focus in southern Moravia

Academia Praha

SARTORELLI, A.C.; FISCHER, D.S.; DOWNS, W.G. (1966)

Use of Sarcoma 180/TG to prepare hyperimmune ascitic fluid in the mouse

J. Immunol. 96: 676-682

SCHULER, R. (1983)

Herstellung und Isolierung von Männchen - gekoppelten Translokations-Linien bei der Stechmücke Aedes vexans (Meigen)

Diss. Inst. f. Genetik, Joh.-Gutenberg-Univ. Mainz

SCHWANZER, V. (1969)

Adsorption of Tahyna virus to some cell systems and tissue homogenates in vitro
in: Arboviruses of the California Complex and the Bunyamwera Group; hrsg. von Bardos, V. et al. S. 249-253

Publ. House Slovak Acad. Sci. Bratislava

SEFCOVICOVA, L.; WALLNEROVA, Z. (1967)

Cytopathic activity of the extraneural variant of Tahyna virus in the GMK cell line

Acta virol. 11: 270

SIMKOVA, A. (1966)

Quantitative study of experimental Tahyna virus infection in hibernating hedgehogs

J. Hyg. Epidem. Microbiol. Immunol. 10: 499-509

SIMKOVA, A.; DANIELOVA, V. (1969)

Experimental infection of chimpanzees with Tahyna virus by Culiseta annulata mosquitoes

Folia parasitol. 16: 255-263

SIMKOVA, A.; DANIELOVA, V.; BARDOS, V. (1960)

Experimental transmission of the Tahyna virus by Aedes vexans mosquitoes

Acta virol. 4: 341-347

SIMKOVA, A.; WALLNEROVA, Z. (1968)

Tahyna Virus distribution in viremic hamster blood

Acta virol. 12: 397-402

SLUKA, F. (1969)

The clinical picture of the Tahyna virus infection in: Arboviruses of the California Complex and the Bunyamwera Group; hrsg. von Bardos, V. et al. S.331-314

Publ. House Slovak Acad. Sci. Bratislava

SMITH, A.L.; TIGNOR, G.H. (1980)

Host cell receptors for two strains of Sindbis virus

Arch. Virol. 66: 11-26

SPEARMAN, C. (1908)

The method of "right or wrong cases" (constant stimuli) without Gauss's formulae

Brit. J. Psychol. 2: 227

SPIECKERMANN, D.; ACKERMANN, R. (1972)

Isolierung von Viren der California Encephalitis-Gruppe aus Stechmücken in Nord-Bayern

Zentralbl. Bakteriol. Orig. A 221: 283-295

SPIECKERMANN, D.; ACKERMANN, R. (1974)

Untersuchungen über Naturherde des Tahyna-Virus in Süddeutschland

Zentralbl. Bakteriol. Orig. A 228: 291-295

SYMINGTON, J.; SCHLESINGER, M.J. (1978)

Characterization of a Sindbis virus variant with altered host range

Arch. Virol. 58: 127-136

TESH, R.B.; GUBLER, D.J.; ROSEN, L. (1976)

Variation among geographic strains of Aedes albopictus in susceptibility to infection with Chikungunya virus

Am. J. Trop. Med. Hyg. 25: 326-335

TURELL, M.J.; HARDY, J.L. (1980)

Carbon dioxide sensitivity of mosquitoes infected with California Encephalitis virus

Science 209: 1029-1030

WALLNEROVA, Z. (1969)

Fluorescent antibody technique in study of experimental Tahyna and LaCrosse virus infection in suckling mice in: Arboviruses of the California Complex and the Bunyamwera Group; hrsg. von Bardos, V. et al. S. 237-243

Publ. House Slovak Acad. Sci. Bratislava

WALLNEROVA, Z. (1973)

Thoracic duct lymph and blood of mice at early stages of Tahyna and Semliki Forest virus infection

Acta virol. 17: 511

WATTS, D.M.; PANTUWATANA, S.; DeFOLIART, G.R; YUILL, T.M.; THOMPSON, W.H. (1973)

Transovarial transmission of LaCrosse virus in the mosquito Aedes triseriatus

Science 182: 1140-1141

WATTS, D.M.; THOMPSON, W.H.; YUILL, T.M.; DeFOLIART, G.R.; HANSON, R.P. (1974)

Overwintering of LaCrosse virus in Aedes triseriatus

Am. J. Trop. Med. Hyg. 23: 694-700

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hans-Werner Schlipköter danke ich herzlich für die Überlassung des Themas sowie eines Arbeitsplatzes im Institut.

Bei Herrn Dr. Jürgen Pilaski möchte ich mich für die Betreuung der Arbeit und seine wohlwollende Offenheit gegenüber allen Vorschlägen und Ideen bedanken, welche die Freude an dieser Arbeit erhalten bleiben ließ.

Die Durchführung dieser Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne das freundliche Entgegenkommen von Prof. Dr. Hannes Laven, damals Leiter des Instituts für Genetik der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, an dessen Institut ich mich 1979 mit den Methoden der Aedes vexans Zucht vertraut machen konnte. Ihm und seinen Mitarbeitern, Herrn Dr. Kuhn, Herrn Friederich, Herrn Schuler, Herrn Schreiber, Herrn Dubey, Herrn Deschner u.a. möchte ich für ihr Interesse, ihre geduldige Belehrung, tätige Unterstützung und besonders für die herzliche, freundliche Aufnahme danken.

Herrn Dr. Vojtech Bardos, Prag, (1914 - 1982) schulde ich Dank für die Überlassung des Tahyna-Virusstammes "236".

Den Mitarbeiterinnen im Viruslabor, Frau Lühr und Frau Paulus, möchte ich herzlich für ihre stete Hilfsbereitschaft und unglaublich viel Gespültes danken, ebenso allen übrigen Mitarbeiter(inne)n des MIU für ihren jeweiligen Anteil am Zustandekommen dieser Arbeit. Für tätige Hilfe beim Aufbau des Insektariums danke ich den Herren Becker, Handreck, Langhals und Zollenkopf.

Ich danke auch allen Freunden, Bekannten und zufälligen Zuhörern, die sich mit endloser Geduld die ebenso endlosen Sorgen um die zweiflügeligen Quälgeister angehört haben. Aedes vexans trägt ihren Namen zu Recht.

Lebenslauf

Am 13. März 1958 wurde ich als zweiter Sohn von Marianne (geb. Sachs) und Hans Günter Nelles in Düsseldorf geboren. 1962 zogen wir nach Duisburg-Wedau um, wo ich von 1964 bis 1967 die Volksschule "Am See" besuchte. 1967 wechselte ich auf das humanistische Landfermann-Gymnasium über, wo ich 1976 mein Abitur bestand. Das Schuljahr 1974/75 verbrachte ich als Austauschschüler in Richmond, Indiana/USA.

Im Wintersemester 1976/77 nahm ich mein Medizinstudium an der Universität Düsseldorf auf, wo ich auch im Mai 1983 mein Staatsexamen ablegte. Am 27. Juni 1983 wurde ich als Arzt approbiert.

Düsseldorf, am 30. September 1983

Frank Nelles

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353